

TABLE DE MATIERES

REMERCIEMENTS

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES ANNEXES

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

GLOSSAIRE

INTRODUCTION GENERALE..... 1

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 2

I-1- Généralités sur *Pothos scandens*..... 2

I-1-1- Systématique. 2

I-1-2- Description botanique..... 3

I-1-3- Ecologie et répartitions géographiques..... 4

I-1-4- Utilisations..... 5

I-2- Généralités sur les champignons endophytes..... 6

I-2-1- Définition..... 6

I-2-2- L'endophytisme ou la relation plante hôte-endophytes..... 6

I-2-2-1- Origines et modes de transmission des endophytes
dans la plante..... 6

I-2-2-2- Distributions et localisation des endophytes dans la plante..... 7

I-2-2-3- Importance des facteurs environnants de la plante..... 7

I-2-2-4- Les types d'endophytes..... 7

I-2-2-5- Particularités des champignons endophytes..... 8

I-2-3- Importance des microorganismes endophytes.....	8
I-2-3-1- Pour la plante hôte.....	9
I-2-3-2- Pour les besoins de l'humanité.....	9
I-2-3-2-1- Dans l'agriculture.....	9
I-2-3-2-2- Dans la médecine.....	9
I-2-4- Isolement, purification, identification et conservation des champignons endophytes.....	10
I-2-4-1- Etapes préliminaires.....	10
I-2-4-2- Isolement et purification.....	10
I-2-4-3- Identification.....	11
I-2-4-4- Conservation.....	11
 PARTIE II : ETUDES EXPERIMENTALES.....	13
II-1- Première étape : Test préliminaire.....	13
II-1-1- Principe.....	13
II-1-2- Matériels utilisés.....	14
II-1-3- Revivification des champignons endophytes.....	14
II-1-4- Test de dualité culturale.....	15
II-1-5- Résultats.....	15
II-2- Deuxième étape : Production de métabolites secondaires.....	18
II-2-1- Principe.....	18
II-2-2- Matériels utilisés.....	18
II-2-3- Rajeunissement des souches.....	19

II-2-4- Culture par fermentation.....	19
II-2-5- Résultats.....	19
II-3- Troisième étape : Extraction des métabolites secondaires.....	21
II-3-1- Principe.....	21
II-3-2- Matériels utilisés.....	21
II-3-3- Prétraitement.....	21
II-3-4- Traitements physiques.....	21
II-3-5- Traitements chimiques.....	22
II-3-6- Résultats.....	24
II-4- Quatrième étape : Tests d'activité antimicrobienne	25
II-4-1- Principes.....	25
II-4-2- Matériels utilisés.....	27
II-4-3- Rajeunissement des souches.....	28
II-4-4- Méthode de diffusion sur gélose.....	29
II-4-4-1- Avec des champignons phytopathogènes.....	29
II-4-4-2- Avec des bactéries et levure.....	29
II-4-5- Méthode de microdilution.....	30
II-4-6- Méthode de CCM-bioautographie directe.....	32
II-4-7- Résultats.....	34
II-5- Cinquième étape : Criblage chimique des extraits actifs.....	43
II-5-1- Principe.....	43
II-5-2- Matériels utilisés.....	43
II-5-3- Préparation de la plaque de CCM.....	43

II-5-4- Révélatons.....	44
II-5-5- Résultats.....	45
PARTIE III : INTERPRETATIONS ET DISCUSSION	47
II-1- Test préliminaire.....	47
II-2- Production de métabolites secondaires.....	47
II-3- Extraction des métabolites secondaires.....	49
III-4- Tests d'activité antimicrobienne	50
III-4-1- Méthode de diffusion sur gélose.....	50
III-4-2- Méthode de microdilution.....	52
III-4-3- Méthode de CCM-bioautographie directe.....	53
III-5- Criblage chimique des extraits actifs.....	55
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	56
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXES	

LISTE DES ABREVIATIONS

- AcOEt : Acétate d'éthyle.
- ADN : Acide Désoxyribonucléique.
- CCM : Chromatographie sur couche mince.
- CMI : Concentration minimale inhibitrice.
- CMB : Concentration minimale bactéricide.
- DCM : Dichlorométhane.
- DMSO : Diméthyle sulfoxyde.
- IMRA: Institut Malgache de Recherches Appliquées.
- KOH : Hydroxyde de potassium ou potasse.
- Mcf : Mc Farland.
- MeOH : Méthanol.
- MHA : Mueller Hinton Agar.
- MHB: Mueller Hinton Broth.
- MTT: Bromure de 3-(4,5-diméthyl-2-thiazolyl)-2-diphényl-2H-tetrazolium.
- NA : Nutritive Agar/Nutritive Broth.
- NB : Nutritive Broth.
- NP/PEG: Natural Product Polyethylen Glycol.
- OA : Oatmeal Agar.
- OB : Oatmeal Broth.
- PDA: Potatoes Dextrose Agar.
- PDB : Potatoes Dextrose Broth.
- v/v : Volume sur volume.
- UFC: Unité Formatrice de Colonies.
- UV : Ultraviolet.
- R_f : Référence frontale ou Rapport frontal.
- SAB: Sabouraud.

LISTE DES ANNEXES

	Pages
ANNEXE I : Liste des matériels et équipements	I
ANNEXE II : Compositions des milieux de culture	II
ANNEXE III : Les souches de référence ou souches indicatrices	III
ANNEXE IV : Liste des solvants d'extraction par ordre de polarité ascendante.....	VI
ANNEXE V : Norme utilisée pour la lecture d'un antibiogramme.....	VII
ANNEXE VI : Structure des parois des bactéries et de la levure.....	VII
ANNEXE VII : Composition des révélateurs chimiques utilisés pour le criblage chimique des extraits	X

LISTE DES FIGURES

	Page s
Figure 1 : <i>Pothos scandens</i>	
...	2
Figure 2 : Schéma des différentes parties aériennes de <i>Pothos scandens</i>	4
Figure 3 : Inhibition des champignons phytopathogènes indicateurs par les champignons endophytes n°1867 et n°1918 par rapport au témoin négatif.....	16
Figure 4 : Champignons endophytes n° 1867 et n°1918 sur milieu solide PDA après 72 heures d'incubation.....	19
Figure 5 : Cultures par fermentation des souches n°1867 et 1918 sur milieux liquides PDB et OB.....	20
Figure 6 : Schéma récapitulatif du procédé d'extraction en cascade avec des solvants organiques à polarité ascendante.....	23
Figure 7 : Distribution des différents échantillons dans une microplaque à 96 puits.....	31
Figure 8 : Schéma d'une plaque de CCM.....	33
Figure 9 : Inhibition de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> par les extraits 7, 8, 19 et 20	35
Figure 10 : Inhibitions des souches de bactéries et levure par les extraits.....	38
Figure 11 : Microplaques contenant l'inhibition de <i>Bacillus subtilis</i> par l'extrait17.....	40
Figure 12 : Chromatogramme de l'extrait 17 après observation sous la lumière UV avec les rapports frontaux des bandes	41
Figure 13 : Chromatogramme de l'extrait 17, couverte de culture de <i>Bacillus</i> <i>subtilis</i> , pulvérisé de MTT	42
Figure 14 : Chromatogrammes après révélation avec de l'anisaldéhyde sulfurique 5 % avec des fractions non marquées (A), marquées (B) et la bioautographie de l'extrait 17 testé sur <i>Bacillus subtilis</i> (C)	46

LISTE DES TABLEAUX

	Pages
Tableau 1 : Diamètres des mycéliums (mm) des différents champignons phytopathogènes indicateurs.....	15
Tableau 2 : Pourcentage d'inhibition (%) des champignons phytopathogènes indicateurs par les endophytes n°1867 et n°1918	15
Tableau 3 : Poids des extraits secs (mg) issus des cultures par fermentation des champignons endophytes.....	24
Tableau 4 : Diamètres (mm) et pourcentages d'inhibition (%) de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> par les extraits à l'acétate d'éthyle issus du champignon n°1867	35
Tableau 5 : Diamètres d'inhibition des bactéries à Gram positif, de <i>Salmonella typhi</i> et de <i>Candida albicans</i>	37
Tableau 6 : Pourcentages d'inhibition de <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Candida albicans</i> et révélations avec du MTT	39
Tableau 7 : Composition chimique de l'extrait 17.....	45

GLOSSAIRE

Ascomycète :	ordre de champignons dont les spores naissent dans des asques (cellule en forme de sac, libre ou contenue dans une fructification à l'intérieur de laquelle se forment les ascospores).
Bactéricide :	qui a le pouvoir de tuer les bactéries.
Bactériostatique :	qui a le pouvoir d'inhiber la croissance des bactéries.
Baie :	fruit charnu, indéhiscant ne contenant pas de noyau.
Basidiomycète :	ordre de champignons dont les spores naissent sur des basides (cellule cloisonnée ou non, spécialisée dans la production de basidiospores).
Cunéiforme :	qui a la forme d'un coin.
Elliptique :	en forme d'ellipse.
Explant :	fragment d'organe ou de tissus prélevé d'un organisme vivant et cultivé <i>in vitro</i> .
Hermaphrodite :	fleur portant à la fois des organes reproducteurs mâles et femelles.
Hyphe :	filament mycélien qui constitue l'appareil végétatif des champignons.
Lancolé :	de forme étroitement ovale.
Mycélium :	appareil végétatif du champignon constitué d'un ensemble de filaments appelés hyphes.
Obové ou obovoïde :	ayant la forme d'un contour d'œuf renversé.
Pédoncule :	support allongé et étroit.
Pétiole :	partie qui sert à la jonction de la feuille sur la tige.
Ubiquitaire :	qui se trouve partout en même temps.
Vermifuge :	remède propre à faire expulser les vers intestinaux.

- Sessile :** sans support.
- Spadice :** inflorescence présentant un axe charnu et épaissi portant des fleurs sessiles ou subsessiles souvent réduites.
- Spathe :** grande bractée formant une gaine enveloppant l'inflorescence, ouverte latéralement.
- Spore :** organe de conservation ou de propagation des champignons issu de la multiplication asexuée (conidie..) ou sexuée (ascospore, basidiospore...).
- Sporulation :** émission de spores.
- Symbiose :** association de deux espèces distinctes dont la vie en commun est profitable à chacune d'elles.

INTRODUCTION

GENERALE

Depuis la découverte des microorganismes, de nombreuses substances et molécules à usage courant résultent de leurs exploitations et de leurs utilisations. L'étude des activités des microorganismes présente, en effet, un des plus intéressants développements des connaissances scientifiques et technologiques humaines [54]. Les mécanismes de résistance aux antibiotiques et la difficulté à trouver des molécules efficaces contre certaines maladies ont suscité un besoin urgent de développer perpétuellement de nouvelles molécules avec de nouveaux et larges spectres d'action.

Les endophytes sont des microorganismes qui colonisent les tissus internes des plantes sans causer d'effets négatifs immédiats et apparents pour la plante hôte [5]. Ils ont été découverts récemment et ils sont relativement des sources potentielles de nouveaux produits naturels utiles en médecine, en agriculture et en industrie.

L'étude portant sur les endophytes présente de multiples intérêts : elle mène à la connaissance de leurs interactions avec leur hôte et à la découverte de nouveaux taxa. Il est estimé que 100.000 espèces de champignons sur 1.000.000 seulement ont été décrites de nos jours [26]. Elle induit également un impact économique très important, car les molécules qui en sont nées peuvent valoir plusieurs millions de dollars, c'est le cas du « Paclitaxel », un agent anticancéreux isolé d'un endophyte du bois de l'if, *Taxus*. [59]. Les recherches qui ont été entreprises sur les endophytes, notamment sur les champignons, ont été fructueuses. Elles ont abouti à la découverte de molécules bioactives telles que des molécules antimicrobiennes, antivirales, anticancéreuses, antioxydantes et antidiabétiques.

La présente étude a pour objectif de valoriser les champignons endophytes de *Pothos scandens* notamment par la recherche des activités antimicrobiennes des métabolites secondaires issus de ces champignons. Pour atteindre ces objectifs, cinq étapes ont été effectués :

- les tests préliminaires,
- la production de métabolites secondaires,
- l'extraction des métabolites secondaires,
- les tests d'activité antimicrobienne,
- le criblage chimique des métabolites secondaires actifs et des fractions actives.

PARTIE I :

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Rapport-Gratuit.com

I-1- GENERALITES SUR *Pothos scandens* :**I-1-1- Systématique [42] :**

<u>Règne</u> :	VEGETAL
<u>Sous-règne</u> :	TRACHEOBIONTA
<u>Division</u> :	MAGNOLIOPHYTA
<u>Classe</u> :	LILIOPSIDA
<u>Sous-classe</u> :	ARECIDAE
<u>Ordre</u> :	ALISMATALES
<u>Famille</u> :	ARACEAE
<u>Sous-famille</u> :	POTHOIDEAE
<u>Genre</u> :	<i>Pothos</i>
<u>Espèce</u> :	<i>scandens</i>
<u>Noms vernaculaires</u> :	tampina, ravitampina, ravintampana, ramatsara, vahimitampina, vahimitapina, tsirimasoandro, ranovao, tsirimasoandro, vahitampy, ramiretampina [8].

**Figure 1: *Pothos scandens*.**(Source: <http://www.kreisels.com>)(Source: <http://www.tropicos.org/image>)

I-1-2- Description botanique [1, 8] :**➤ Appareil végétatif :**

Pothos scandens est une liane avec des feuilles vertes foncées, vernissées, disposées de part et d'autre de la tige.

La racine de *Pothos scandens* peut atteindre jusqu'à plusieurs mètres de long. Ses tiges sont entre 1 à 2 cm d'épaisseur, avec des entrenœuds longs de 1,5 à 2 cm de longueur.

Les feuilles de *Pothos scandens* sont distiques, lancéolées et elliptiques. Elles possèdent des pétioles élargis en ailes de 0,5 à 7 cm x 0,2 à 2 cm, qui sont un peu cunéiformes vers la base, arrondies vers le haut. Le limbe est de 7,5 à 30 cm² de surface ; sa face supérieure est verte foncée et sa face inférieure, un peu plus claire. Les nervures médianes sont épaisses dont une à trois paires de nervures latérales primaires presque parallèles et des nervures secondaires et tertiaires plus ou moins réticulées (Figure 2).

➤ L'appareil reproducteur :

Pothos scandens a des fleurs épaisses. Le pédoncule est courbé et peut faire un angle de 180°, sa couleur varie de rougeâtre à pourpre vif. Les spathes sont largement elliptiques. Leur couleur est pourpre avec une pointe verte à l'extérieur et jaune clair à l'insertion du spadice. Les spadices sont jaunes vifs, de 4 à 8 mm de diamètre. Les fleurs sont hermaphrodites avec six tépales infléchis vers le haut, six étamines opposipétales qui sont rangées sur deux cercles. Ces étamines ont des filets aplatis et courts de 0,4 mm. Les ovaires sont hexagonaux, et peuvent être aplatis vers le haut. Ils ont un stigmate sessile formant une petite pointe. Ces ovaires ont trois loges avec chacune une ovule anatrophe.

Les fruits sont de couleur orange à rouge et sous forme de baies ellipsoïdes à obovoïdes de 10 à 15 mm x 5 à 8 mm. Ils ont une à trois graines qui sont ellipsoïdes de 12 mm x 6 mm (Figure 2). Le nombre de chromosomes de cette plante est de $2n = 24$.

Selon Bogner (1975), *Pothos scandens* a une très grande variabilité, sur la forme des feuilles et du spadice.



Figure 2 : Schéma des différentes parties aériennes de *Pothos scandens*.

Source : J. Bogner. 1975. Flore de Madagascar et des Comores.

I-1-3- Ecologie et répartitions géographiques [8, 35, 40, 41] :

Pothos scandens est une plante sciaphile, grimpant sur les arbres et les rochers. Elle se rencontre dans la forêt, surtout dans les zones humides. L'altitude varie de 0 à 2100 mètres. Cette plante est en fleurs et en fruits toute l'année.

Pothos scandens est une plante originaire d'Asie, mais elle est également rencontrée en Afrique.

- En Asie : Bengladesh, Inde, Indonésie, Malaisie, Chine, Laos, Philippines, Sri Lanka, Thaïlande et Vietnam.
- En Afrique :
 - A Madagascar :
 - Au Nord : Marojejy, Antsatsaka, Lokobe, Nosy Be, Manongarivo, Masoala, Sambava, Njanahary Be Sud, Bobakilandy, Montagne d'Ambre, Tsaratanàna, Marovato, Galoko, Kalabenono, Morafeno.
 - A l'Ouest : Namoroka, Ankaizina, Bemaraha, Anjanaharibe Sud.
 - A l'Est : Analamazaotra, Zahamena, Nosy Mangabe, Tampolo, Ambila Lemaitso, Soanierano Ivongo, Betampona, Manompana, Andranobe, Ambanizana, Masoala, Antanambao Ambodimanga, Hiaraka, Antaimby, Vatomandry, Ambatovy.
 - Au Sud : Ranomafana, Vondrozo, Andringitra, Midongy Atsimo, Farafangana, Fatihita, Manombo, Nosiala, Andohahela, Manantately, Mandena, Lakandava, Maherikely.
 - A Mayotte, aux Seychelles, et aux îles Comores (Anjouan, Grande Comores).

I-1-4- Utilisations :

Pothos scandens a de multiples utilisations, elle est souvent utilisée comme plante d'ornementation [32]. Ses feuilles sont utilisées contre le diabète et ses tiges servent d'antidote [1] aux morsures de serpent [11].

En Thaïlande, *Pothos scandens* est utilisée sous forme de tisane. La racine dégrade les calculs biliaires tandis que la tige soigne les maux de ventre [44]. Les fruits et les feuilles sont appliqués sous forme de compresse sur les blessures pour coaguler le sang [41].

En Myanmar Birmanie, les feuilles de *Pothos scandens* sont servies sous forme de thé par les Shah [41] et en Malaisie, la plante est utilisée comme vermifuge [9].

I-2- GENERALITES SUR LES CHAMPIGNONS ENDOPHYTES :

Les endophytes furent découverts par Darnel, en Allemagne, en 1904 [64]. Etymologiquement, le mot « endophyte » est dérivé de deux mots grecs : *endon* et *phyton* qui signifient respectivement « dedans » et « plante ». Le mot **endophyte** signifie alors littéralement **dans la plante**. Ceci désigne tout être qui vit dans la plante, incluant les bactéries [30], les champignons [56], les algues [38] et les insectes [18].

I-2-1- Définition des endophytes :

D'après Stone et ses collaborateurs (2000), les endophytes sont ceux qui vivent à l'intérieur des tissus d'une plante morphologiquement saine et ne peuvent causer des symptômes apparents et immédiats à son hôte [48].

I-2-2- L'endophytisme ou la relation entre la plante et ses endophytes :

La cohabitation des endophytes avec leur hôte n'est pas au hasard. Il y a des microorganismes qui sont ubiquitaires (des genres *Phoma*, *Fusarium*, *Cladosporium*,...) et certains sont spécifiques à la plante hôte [56]. De plus, l'existence de signaux de reconnaissance, sous forme de chimiotactismes entre l'hôte et les microorganismes, a été affirmée par certains auteurs [57].

I-2-2-1- Origines et modes de transmission des endophytes dans la plante :

Les endophytes peuvent être présents dans les semences ou les graines où ils sont en association symbiotique avec leur hôte [30, 66], le mode de transmission est à ce moment, « vertical » [5]. Ces endophytes s'éparpillent dans les différentes parties de la plante pendant son développement.

Les endophytes peuvent également provenir de différentes sources comme le sol ou la rhizosphère (zone dense en colonisation microbienne) ou bien, ils sont véhiculés par le vent et la pluie [24]. Ils sont alors déposés sur la surface des différentes parties de la plante puis pénètrent à l'intérieur de la plante par l'intermédiaire des ouvertures se trouvant à la surface des organes telles que les stomates, les lenticelles ainsi que les blessures causées par les agressions externes. Ils colonisent les différentes parties de la plante. Ainsi, ce mode de transmission est dit « horizontal ».

I-2-2-2- Distributions et localisation des microorganismes endophytes :

Tous les espaces intercellulaires et intracellulaires des tissus de la plante peuvent être colonisés par les endophytes [24, 66]. Ainsi, ils peuvent être rencontrés au niveau des racines et tubercules, des tiges, des feuilles, des fruits et des graines [34].

I-2-2-3- Importance des facteurs environnants de la plante :

Plusieurs facteurs environnants de la plante peuvent influencer la diversité de ses endophytes, à savoir son âge, sa répartition géographique, sa biochimie, sa physiologie ainsi que la période de collecte de la plante [30, 66].

La densité des endophytes est diverse d'un site de collecte à un autre et la taille de la population endophytique dans chaque partie des tissus d'une plante de même espèce, sur un même site peut être différente. Néanmoins, les endophytes des espèces identiques sont communs [66]. L'écologie de la plante hôte comme la nature du sol (pH, salinité, texture et matières organiques présentes) et le climat du site de collecte jouent aussi un rôle important sur la densité et la taille des endophytes dans chaque plante [24].

I-2-2-4- Les types d'endophyte :

Les endophytes entretiennent diverses relations avec leur hôte. Suivant les relations existantes, il y a trois grands types d'endophytes [55] :

- Les endophytes asymptomatiques qui ne portent pas préjudice à leur plante hôte durant leur séjour. Ils sont en commensalisme avec leur hôte. C'est une relation à laquelle l'un profite de la présence de l'autre sans le détruire [14].
- Les endophytes symbiotiques ont une association bénéfique et mutuelle avec leur hôte sans se causer du mal. Ces endophytes sont en mutualisme avec leur hôte. Cette relation est avantageuse entre les deux associés [51] comme dans le cas des mycorhizes des orchidées (plantes myco-hétérotrophes) [20].
- Les endophytes pathogènes latents sont des phytopathogènes. Ils deviennent virulents pour la plante lorsque cette dernière se trouve en état de stress, provoqué par les changements de conditions environnementales. Ils sont alors des parasites pour leur hôte.

La relation existante est bénéfique pour ces endophytes mais dévastatrice pour la plante [53]. Ce cas est observé chez le bananier ravagé par la maladie de Panama, causée par le champignon *Fusarium oxysporum* [50]. Ces endophytes pathogènes percent alors les barrières des mécanismes de défense de la plante en produisant des métabolites secondaires phytotoxiques et des exoenzymes qui sont tous les deux des facteurs de virulence [2].

I-2-2-5- Particularité des champignons endophytes :

Un champignon est un organisme eucaryote unicellulaire ou pluricellulaire. Les champignons pluricellulaires ont des cellules qui s'assemblent en un réseau de filaments et constituent le mycélium ou thalle. Ces mycéliums criblent les tissus des plantes. Certains champignons développent des structures spéciales pour maximiser l'absorption des nutriments au niveau des mycéliums [12]. Les champignons sont classés dans les embranchements des Ascomycètes, Deutéromycètes, Basidiomycètes, Chytridiomycètes et Zygomycètes. Les champignons endophytes les plus fréquemment isolés et identifiés appartiennent aux Ascomycètes et aux Deutéromycètes. Les champignons endophytes sont souvent isolés de la partie supérieure de la plante, dans les espaces intercellulaires des cellules périphériques et des vaisseaux conducteurs [65].

I-2-3- Importance des microorganismes endophytes :

Les microorganismes, en général, sont très exploités de nos jours, du fait que grâce à eux et par les épiphénomènes de la biotechnologie, de nouvelles biomolécules actives sont nées, pour servir ou améliorer les produits nécessaires à l'homme.

Par fermentation, par exemple, des molécules d'antibiotiques (*Penicillum*), de vitamines et d'acides organiques ont été obtenues. D'autres molécules ont été conquises et servent actuellement dans l'agriculture et la médecine (*Acetobacter*), dans la sauvegarde de l'environnement (*Pseudomonas*, *Thiobacillus*), dans les industries de fabrication de produits utiles pour l'homme : pesticides (*Bacillus thuringiensis*), peinture, textile, carburants (*Xanthomonas campestris*),

Les microorganismes endophytes en font partie. Ils ne diffèrent des autres microorganismes que par le fait qu'ils ont été isolés de l'intérieur des plantes.

I-2-3-1- Pour la plante hôte :

L'association entre la plante hôte et ses endophytes fait naître plusieurs avantages, dont la protection de l'hôte contre les herbivores par sécrétion d'alcaloïdes toxiques produits par association symbiotique ; ainsi, les mécanismes de défense de la plante hôte sont accrus [10]. Par exemple, *Cryptosporiopsis quercinia*, un champignon endophyte, est à l'origine de la Cryptocandine. C'est une molécule qui est à la fois active contre le champignon phytopathogène *Sclerotinia sclerotiorum* et contre deux champignons pathogènes de l'homme, *Candida albicans* et *Trichophyton sp.* [60]. Les endophytes produisent également des phytohormones (*Gibberella fujikuroi*) et des suppléments nutritionnels (*Rhizobium sp.*) qui améliorent la croissance de la plante hôte [63].

En contre partie, les endophytes ont un large accès aux nutriments [4] et sont protégés contre la dessiccation et les autres organismes qui entrent en compétition avec eux [65].

I-2-3-2- Pour les besoins de l'humanité :

Les microorganismes endophytes sont des sources de biomolécules actives utiles dans l'agriculture et dans la médecine.

I-2-3-2-1- Dans l'agriculture :

Les endophytes sont des agents de biocontrôle, actifs contre les acteurs nuisibles. Ils produisent des molécules qui empêchent les insectes de dévorer les cultures [13]. Ce cas est rencontré avec *Pseudomonas syringae*. Cette bactérie endophyte produit la Pseudomycine, une molécule utilisée en agriculture du fait qu'elle est active contre plusieurs ascomycètes et contre beaucoup d'autres champignons nuisibles de la culture [6].

I-2-3-2-2- Dans la médecine :

Les métabolites secondaires des endophytes offrent un grand espoir dans le domaine de la médecine, car des molécules antibiotiques, antivirales, anticancéreuses, antioxydantes et antidiabétiques ont été déjà isolées.

La Phomopsichalasmine est une molécule très active contre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Candida tropicalis*. Elle est sécrétée par le champignon *Phomopsis sp* [28].

Deux (2) molécules inhibitrices du cytomégalo virus protéase, les acides cytoniques A et B ont été isolées du *Cytonaema sp* [22].

Le Paclitaxel est un agent antitumoral isolé de *Taxomyces andreane*, un endophyte du bois de l'if (*Taxus*) [61].

La Pestacine et l'Isopestacine, des agents antioxydants sont obtenus à partir de *Pestalopsis microspora* qui est un endophyte de *Terminalia morobensis* [25].

La molécule L-783,281 est un métabolite non peptidique sécrété par un champignon endophyte, *Pseudomassaria sp*. Cette molécule agit comme l'insuline et elle est administrée par voie orale [67].

I-2-4- Isolement, purification, identification et conservation des champignons endophytes :

I-2-4-1- Etapes préliminaires :

Les différentes parties de la plante fraîche sont collectées et mises dans un emballage hermétique placé dans une glacière, puis transporté au laboratoire. Les explants subissent des désinfections en surface afin d'éliminer les microorganismes épiphytes. Des protocoles de désinfection doivent être mis au point au préalable pour s'assurer de l'élimination de ces épiphytes. Ils nécessitent l'utilisation d'agents stérilisants comme l'éthanol et l'hypochlorite de sodium. La concentration des solutions et la durée d'utilisation sont en fonction de l'organe utilisé [7]. Afin de valider l'efficacité de la stérilisation en surface, les explants sont déposés sur un support solide, puis incubé à 25°C. Elle est valide si aucune croissance de mycéliums n'apparaît [53].

I-2-4-2- Isolement et purification :

Suite à la désinfection de la surface, les organes sont découpés stérilement en petits morceaux. Ils sont ensuite déposés sur des milieux solides spécifiques de champignons, additionnés d'antibiotique spécifique [3] et sont incubés à 25°C. Les champignons qui

croissent sur les morceaux de feuilles ou de tiges sont repiqués de nouveau sur le même support. L'hyphe est transféré avec le tissu végétal pour s'assurer que la communauté endophytique entière est isolée, car une petite surface d'explant pourrait contenir d'autres hyphes de champignons à croissance lente [48]. Ces transferts sont réalisés jusqu'au jour où il n'y a plus de souche de champignon qui sort des explants.

La purification des souches se fait alors par repiquage successif des champignons isolés sur milieu solide sans antibiotique jusqu'à l'obtention d'une souche pure.

I-2-4-3- Identification :

Pour l'identification des champignons, la sporulation des souches à identifier est nécessaire. Elle est induite par la culture des souches pures sur divers milieux solides ou en les irradiant par des rayonnements UV à la longueur d'onde de 366 nm. Cette dernière méthode est appliquée pour les souches qui n'ont pas pu croître sur les milieux de culture.

Des observations macroscopiques et microscopiques des différents aspects et structures de ces champignons sont effectuées [12]. Les observations macroscopiques consistent à voir les caractères macroscopiques des cultures, tels que la couleur, l'aspect et la présence ou non des pigments. Les observations microscopiques permettent de voir la forme des filaments, la présence ou l'absence de spores ou des organes de fructification, le mode de formation et la morphologie des spores [62]. Enfin, en s'appuyant sur les différents caractères macroscopiques et microscopiques de ces champignons, leurs identifications se font en rapportant les résultats des observations sur des clés dichotomiques d'identification. Le nom du genre ou même de l'espèce de la souche peut être déterminé. Le recours à la biologie moléculaire est nécessaire ou même capital pour l'identification. Elle permet de connaître l'identité nucléaire des souches au niveau de son ADN, de déterminer, plus précisément, le nom de l'espèce et de le caractériser par rapport à d'autres espèces. Cette méthode moléculaire est utilisée pour identifier les champignons qui ne sporulent pas [23] et ceux qui sont viables mais non cultivables [68].

I-2-4-4- Conservation des champignons endophytes :

Les souches de champignons peuvent être conservées par différents moyens, selon sa durée.

- ***Conservation « sous eau » et « sous huile de paraffine » :***

Ces modes de conservation peuvent s'appliquer à toutes les souches de champignon. Des cultures de souche, sur un milieu pauvre incliné dans des tubes vissés, sont effectuées afin de maintenir la souche en croissance ralentie. Les cultures sont ensuite immergées dans de l'eau distillée stérile ou de l'huile de paraffine stérile, puis déposées dans une chambre conditionnée à 10°C.

- ***Conservation par lyophilisation :***

Ce mode de conservation est utilisé spécialement pour les souches de champignons qui sporulent. Cette conservation met en œuvre un liquide lyoprotecteur, le glutamate de sodium, qui congèle et cristallise les spores à – 40°C. La sublimation de ces cristaux de spores les rend secs. Ils sont mis dans des petits tubes stériles et sont scellés et rangés dans des boîtes placées à température ambiante.

Les conservations « sous eau » et « sous huile de paraffine » sont des conservations à court et moyen terme et la conservation par lyophilisation est une conservation à long terme.

PARTIE II :
ETUDES EXPERIMENTALES

II-1- PREMIERE ETAPE : TEST PRELIMINAIRE.

Dans la collection de champignons du laboratoire de microbiologie de l'IMRA, 115 souches de champignons endophytes de *Pothos scandens*, non identifiées, sont conservées. Parmi ces champignons, 37 souches numérotées de 1850 à 1887 ont été isolées à partir des tiges et 84 souches numérotées de 1901 à 1949 et 1913' à 1949' ont été isolées à partir des feuilles.

Ce test préliminaire a pour objectif de sélectionner le ou les souches de champignons endophytes inhibant la croissance de quatre champignons phytopathogènes indicateurs, par le test de dualité culturale.

II-1-1- Principe :

Un test de dualité est une méthode utilisée pour évaluer l'activité d'un germe non pathogène (champignon endophyte) sur un ou plusieurs germes pathogènes (champignons phytopathogènes). Cette méthode consiste à faire croître, face à face, sur un même milieu solide, les deux champignons en dualité. Sur un autre milieu solide, le champignon phytopathogène en culture seule sert de témoin négatif. Le test est arrêté après cinq (5) jours de culture ou lorsque les deux champignons en dualité se rencontrent, ou bien quand le mycélium du témoin négatif atteint le bord de la boîte de Pétri. Les diamètres des mycéliums sont mesurés. Le taux d'inhibition de la croissance du champignon indicateur est calculé suivant la formule :

$$P (\%) = 100 - \left(\frac{T}{C} \times 100 \right)$$

Avec :

P (%) : pourcentage d'inhibition du champignon phytopathogène par l'endophyte.

T (mm) : diamètre du mycélium du champignon phytopathogène en culture avec l'endophyte (test).

C (mm) : diamètre du mycélium du champignon phytopathogène en culture seule (témoin négatif).

II-1-2- Matériels utilisés :

- Les 115 souches de champignons endophytes de *P. scandens*.
- Les phytopathogènes de référence (Annexe III) :
 - *Colletotrichum gloeosporioides*,
 - *Fusarium oxysporum*,
 - *Guignardia sp*,
 - *Rhizoctonia solani*.
- Milieu solide : PDA ou Potato Dextrose Agar.

II-1-3- Revivification des souches de champignons :

Toutes les manipulations se déroulent sous une hotte à flux laminaire et dans un rayon de 20 cm autour de la flamme d'un bec bunsen.

Les souches sont prélevées à l'aide d'une anse stérile. Elles sont ensuiteensemencées sur du milieu PDA stérile. Puis les cultures sont incubées à 25°C pendant 72 heures.

II-1-4- Test de dualité :

A partir des souches de champignons endophytes et phytopathogènes revivifiées précédemment, deux portions d'environ 1 cm² de mycélium de phytopathogène sont prélevées à l'aide d'une anse stérile. Les deux portions de mycélium sont ensuite déposées sur deux milieux PDA, la face du mycélium étant contre le milieu de culture. Sur l'une de ces cultures, une autre portion de mycélium d'endophyte est déposée face à celle du phytopathogène, laissant une distance de 6 cm entre-elles. L'autre culture seule sert de témoin négatif. Les cultures sont incubées à 25°C.

La culture en dualité dure cinq (5) jours, toutefois, la culture est arrêtée si les mycéliums des deux champignons en dualité se rencontrent, ou bien si le mycélium du champignon phytopathogène en culture seul atteint le bord de la boîte de Pétri.

Les croissances des champignons endophyte/phytopathogène en dualité et les champignons phytopathogènes en culture seule sont observées tous les jours et les diamètres des mycéliums sont mesurés pour pouvoir calculer ainsi le taux d'inhibition.

II-1-5- Résultats :

Après environ 5 jours d'incubation, seules deux souches de champignons d'endophytes n°1867 et n°1918 parmi les 115 souches testées ont montré une inhibition sur *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Guignardia sp* et *Rhizoctonia solani* (Figure 3). Les 113 souches restantes n'ont pas pu inhiber la croissance des champignons phytopathogènes indicateurs testés.

Au bout de 5 jours de culture, les diamètres des mycéliums des 4 souches sont donnés dans le tableau 1 et les pourcentages d'inhibition, dans le tableau 2. La figure 3 montre l'inhibition des champignons phytopathogènes par les souches n°1867 et n°1918.

Tableau 1 : Diamètres (mm) des mycéliums des différents champignons phytopathogènes indicateurs :

Champignons indicateurs	Croissance seule	En dualité	
		1867	1918
<i>C. gloeosporioides</i>	90	47	60
<i>F. oxysporum</i>	90	60	70
<i>Guignardia sp</i>	80	50	48
<i>R. solani</i>	75	50	45

Tableau 2 : Pourcentage d'inhibition (%) des champignons phytopathogènes indicateurs par les endophytes n°1867 et n°1918 :

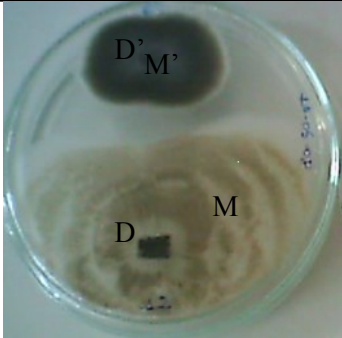
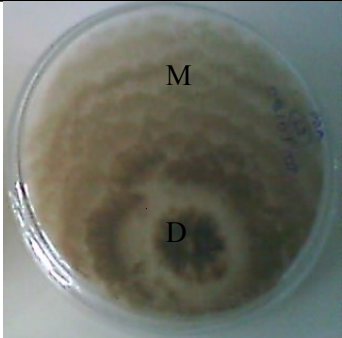
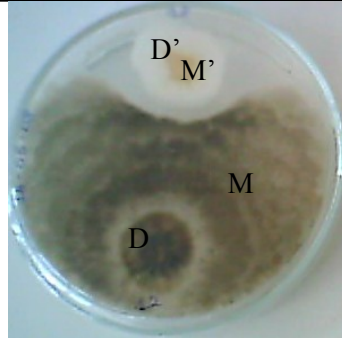
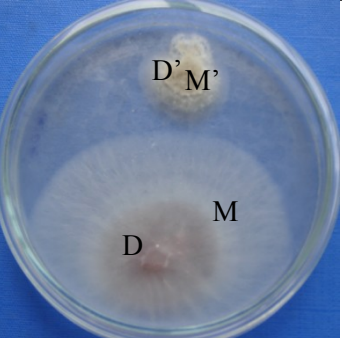
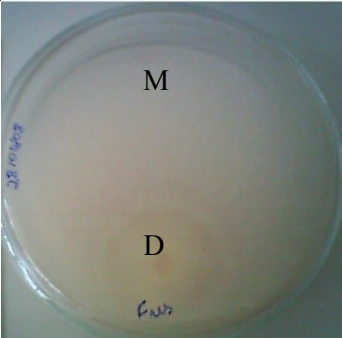
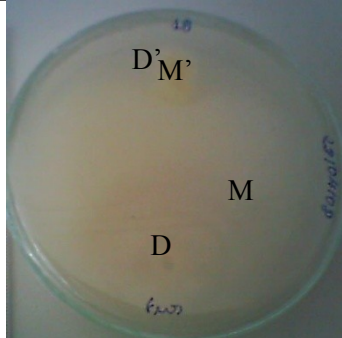
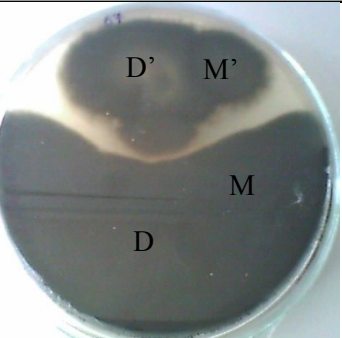
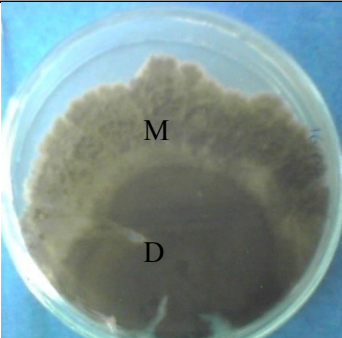
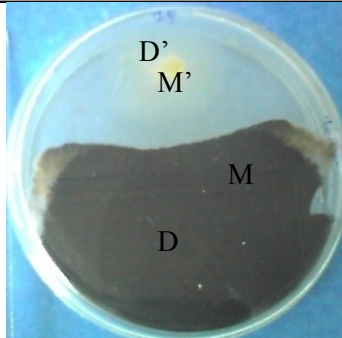
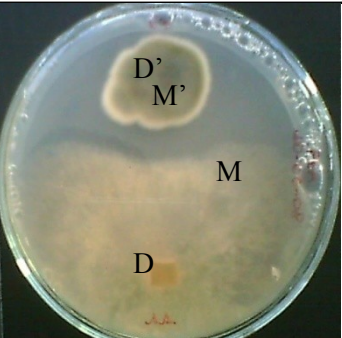
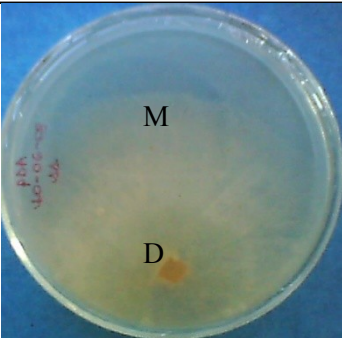
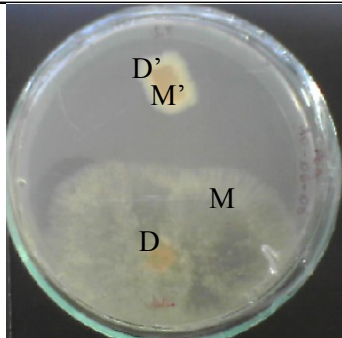
Champignons indicateurs	Champignons endophytes n°	
	1867	1918
<i>C. gloeosporioides</i>	47,77	33,33
<i>F. oxysporum</i>	33,33	22,22
<i>Guignardia sp</i>	37,5	40
<i>R. solani</i>	33,33	40
		
1867 contre <i>C.gloeosporioides</i>	Témoin <i>C.gloeosporioides</i>	1918 contre <i>C.gloeosporioides</i>
		
1867 contre <i>F.oxysporum</i>	Témoin <i>F.oxysporum</i>	1918 contre <i>F.oxysporum</i>
		
1867 contre <i>Guignardia sp</i>	Témoin <i>Guignardia sp</i>	1918 contre <i>Guignardia sp</i>
		
1867 contre <i>R. solani</i>	Témoin <i>R. solani</i>	1918 contre <i>R. solani</i>

Figure 3 : Inhibition des champignons phytopathogènes indicateurs par les champignons endophytes n°1867 et n°1918 par rapport au témoin négatif.

Avec :

- D : dépôt de mycélium de champignon phytopathogène,
- M : mycélium de champignon phytopathogène,
- D' : dépôt de mycélium de champignon endophyte,
- M' : mycélium de champignon endophyte.

II-2- DEUXIEME ETAPE : PRODUCTION DE METABOLITES SECONDAIRES.

A l'issue de l'étape préliminaire, deux souches de champignons endophytes, n°1867 et n°1918, ont été sélectionnées pour la suite de cette étude. Cette étape a pour but d'inciter ces deux champignons endophytes à synthétiser des métabolites secondaires.

II-2-1- Principe :

Les microorganismes peuvent synthétiser des produits dits « métabolites secondaires » au cours de leur croissance, plus précisément au début et pendant la phase stationnaire. Cette étape consiste alors à effectuer des cultures par fermentation de champignon endophyte dans des milieux liquides, dans des conditions de culture adéquates à sa croissance et dans un système isolé ou sans renouvellement de substrat. En effectuant ces cultures par fermentation de champignons endophytes, lorsque ces derniers atteignent la phase de croissance stationnaire, le temps d'incubation est prolongé et ils synthétisent en même temps des métabolites secondaires.

La production de métabolites secondaires peut être favorisée par la présence d'inducteurs qui peuvent être physique (variation de la température d'incubation) ou chimiques (Cu, Zn, Fe, ...), ou bien biologique (souches inertes d'un phytopathogène).

II-2-2- Matériels utilisés :

- Souches de champignons endophytes n°1867 et n°1918.
- Milieux de culture :
 - Milieux liquides additionnés de 1 g/l d'extrait de levure et de 10 ml/l de solution composée de CuSO_4 (0,5 g/l) et de ZnSO_4 (1 g/l) :
 - Bouillon de flocon d'avoine ou Oats Broth (OB).
 - Bouillon de pomme de terre ou Potato Dextrose Broth (PDB).
 - Milieux solides :

- Gélose de flocon d'avoine ou Oats Agar (OA).
- Gélose de pomme de terre ou Potato Dextrose Agar (PDA).

II-2-3- Rajeunissement des souches :

Pour chaque champignon endophyte n°1867 et n°1918, deux petites portions de mycélium sont découpées puis prélevées à l'aide d'une anse stérile refroidie. L'une des portions est ensuite déposée sur OA et l'autre sur PDA. La face du mycélium est déposée contre le milieu. La culture est incubée à 25°C pendant 72 heures.

II-2-4- Culture par fermentation :

Pour chaque souche et à partir de la culture jeune sur milieu solide, effectuée précédemment, 20 portions de mycélium sont découpées et prélevées à l'aide d'une anse stérile. Ces portions sont ensuite ensemencées dans 1000 ml de milieu liquide correspondant (PDB pour les souches sur PDA et OB pour les souches sur OA). La préparation est incubée à 25°C sur un agitateur EDMOND BUHLER à 140 tours/min jusqu'à ce que la masse de mycélium ne se développe plus, puis le temps d'incubation est prolongé de deux semaines. Chaque culture est réalisée en double.

II-2-5- Résultats :

Au cours du rajeunissement des souches, après 72 heures d'incubation, les mycéliums des deux champignons endophytes n°1867 et n°1918 ont atteint respectivement 45 mm et 30 mm. Pour la souche n°1867, la couleur du mycélium est noir et celle de n°1918 est jaune-marron. La figure 4 illustre ces deux champignons endophytes :

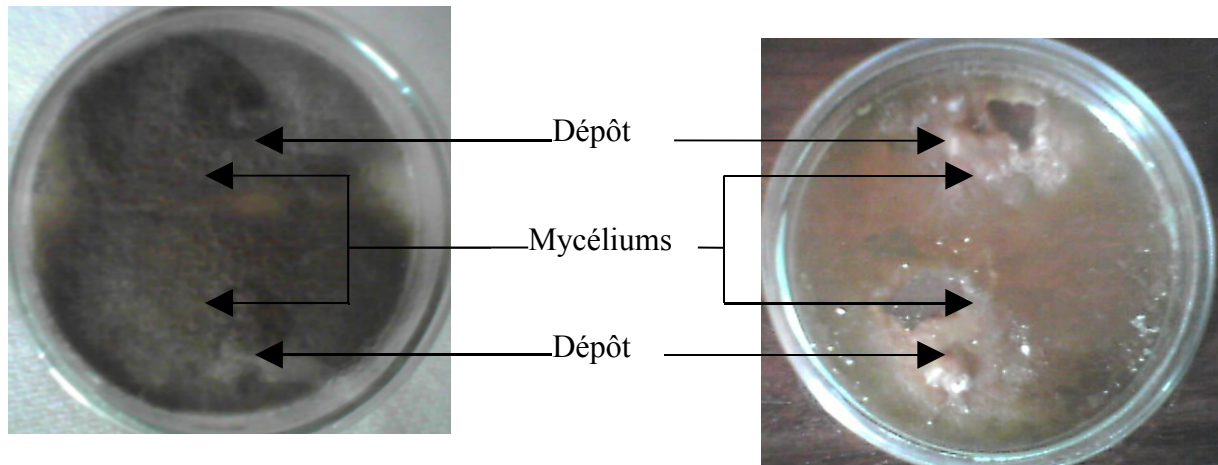


Figure 4 : Champignons endophytes n°1867 (à gauche) et n°1918 (à droite) sur milieu solide PDA après 72 heures d'incubation.

Les mycéliums des deux champignons endophytes n°1867 et n°1918 dans la culture par fermentation sur les milieux liquides PDB et OB se développent progressivement. Macroscopiquement, une masse importante est obtenue au bout de 6 semaines d'incubation. La quantité de mycélium observée au bout de 6 semaines est visiblement constante. Le temps d'incubation est alors prolongé de 2 semaines après les 6 semaines d'incubation précédentes.

La figure 5 montre la quantité de mycélium au bout de 6 semaines de culture :

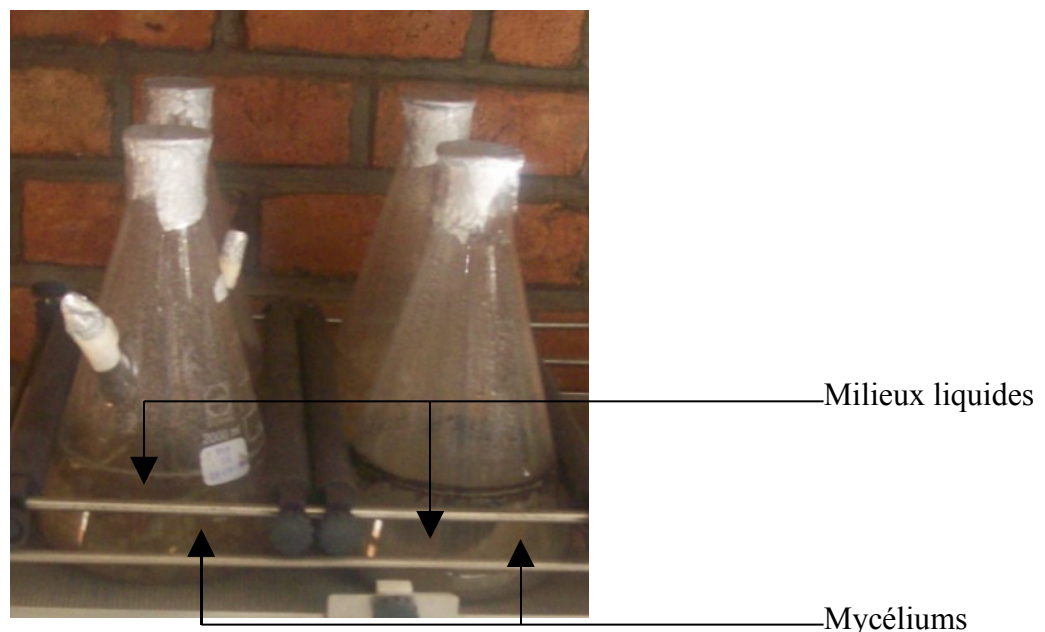


Figure 5 : Cultures par fermentation des souches n°1867 et n°1918 sur milieux liquides PDB (à gauche) et OB (à droite).

II-3- TROISIEME ETAPE : EXTRACTION DES METABOLITES SECONDAIRES.

Cette étape permet d'extraire la quasi-totalité des produits dans la culture par fermentation des champignons endophytes, en utilisant différents solvants organiques.

II-3-1- Principe :

Il s'agit, dans un premier temps, de séparer la culture en deux phases (mycélium et filtrat de culture). Ensuite, chaque phase subit des traitements physiques (broyage, sonification, évaporation, séchage) et des traitements chimiques (utilisation de solvants à différentes polarités), permettant ainsi de solubiliser les produits de chaque phase dans les solvants d'extraction. A la fin, les métabolites secondaires solubles dans chaque solvant sont récupérés et pesés.

II-3-2- Matériels utilisés :

- Cultures par fermentation de 8 semaines des champignons endophytes de *Pothos scandens* n°1867 et n°1918 sur milieux liquides PDB et OB.
- Solvants organiques par ordre de polarité ascendante (Annexe IV) :
 - Dichlorométhane (DCM).
 - Acétate d'éthyle (AcOEt).
 - Méthanol (MeOH).

II-3-3- Prétraitement :

Pour chaque culture par fermentation de 8 semaines de champignons endophytes n°1867 et n°1918, la culture est filtrée à travers une passoire. Deux phases sont obtenues : une phase constituée de mycéliums de champignon endophyte et une autre, de filtrat de culture.

II-3-4- Traitements physiques :

Les mycéliums de chaque culture sont broyés à l'aide d'un broyeur, puis passés à l'ultrason SONOCLEAN pendant 30 min. Le broyat de mycélium est ensuite séché à l'étuve MEMERT ventilée à 40°C pendant 48 heures.

Le filtrat de culture issu de la séparation de chaque culture par fermentation est réduit au quart de son volume initial à l'aide d'un évaporateur rotatif, puis séché à l'étuve MEMERT ventilée à 40°C, jusqu'à obtenir une quantité à peu près égale à 50 ml.

II-3-5- Traitements chimiques :

Après les traitements physiques, 50 ml de dichlorométhane (DCM) sont ajoutés dans les mycéliums secs et dans les filtrats de chaque culture. Le mélange est ensuite passé à l'ultrason SONOCLEAN pendant 30 minutes, puis macéré pendant 12 heures (overnight) sur un agitateur EDMOND BUHLER à 50 tours/min. L'ensemble est ensuite centrifugé à 3000 tours/min pendant 5 minutes à l'aide d'une centrifugeuse HETTICH ROTANTA/R. Deux phases sont obtenues : une phase organique (surnageant) et une phase aqueuse (culot). La phase organique, composée de solvant d'extraction avec ses produits solubles, est récupérée puis séchée et pesée. L'extrait sec obtenu constitue l'**extrait dichlorométhanique**.

Les mêmes opérations sont faites avec la phase aqueuse restante (culot), en utilisant cette fois-ci de l'acétate d'éthyle ou du méthanol pour obtenir respectivement de l'**extrait à l'acétate d'éthyle** et de l'**extrait méthanolique**.

La figure 6 récapitule les procédés d'extraction :

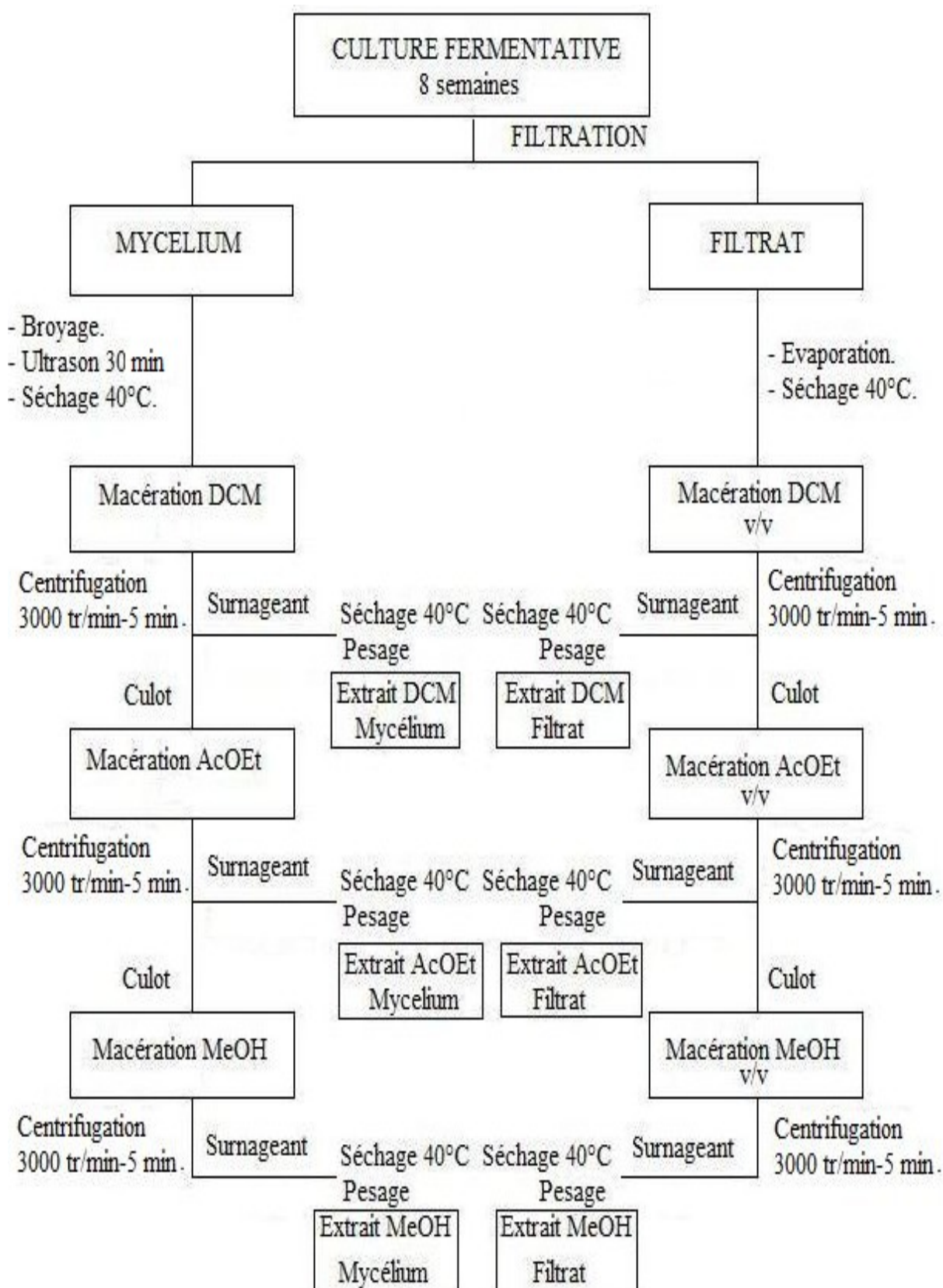


Figure 6 : Schéma récapitulatif du procédé d'extraction en cascade avec des solvants organique à polarité ascendante.

II-3-6- Résultats :

Après l'extraction en cascade par des solvants organiques à polarité ascendante, à partir des cultures par fermentation des souches n°1867 et n°1918, 24 extraits (numérotés de 1 à 24) sont obtenus dont 8 extraits dichlorométhaniques, 8 extraits à l'acétate d'éthyle et 8 extraits méthanoliques (Tableau 3). Pour chaque culture par fermentation sur milieu liquide PDB ou OB de champignons endophytes n°1867 et n°1918, un extrait est issu de chaque solvant organique utilisé à partir du mycélium et du filtrat de culture.

Le poids de chaque extrait de métabolites secondaires, après séchage à l'étuve, est représenté dans le tableau 3 :

Tableau 3 : Poids des extraits secs (mg) issus des cultures par fermentation des champignons endophytes :

Souche n°		1918		1867	
Sources	Milieux Extraits	PDB	OB	PDB	OB
Mycélium	DCM	206,40 (1)	331,10 (2)	90,30 (3)	153,10 (4)
		86,80 (5)	63,40 (6)	88,20 (7)	56,40 (8)
	AcOEt	27,80 (9)	50,80 (10)	155,60 (11)	144,30 (12)
		285,30 (13)	277,10 (14)	214,70 (15)	298,50 (16)
	MeOH	28,70 (17)	98,10 (18)	36,20 (19)	32,10 (20)
		3050 (21)	2812 (22)	1240 (23)	148,80 (24)

() : Numéros des extraits.

II-4- QUATRIEME ETAPE : TESTS D'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE.

Cette étape a pour objectif d'évaluer l'activité des métabolites secondaires extraits au cours de l'étape précédente, sur des souches indicatrices. Pour cette évaluation, trois méthodes sont utilisées : **la méthode de diffusion sur gélose, la méthode de microdilution et la méthode de chromatographie sur couche mince (CCM)-bioautographie directe.**

II-4-1- Principes :

La méthode de **diffusion sur gélose** est une méthode préliminaire permettant de repérer les produits qui sont actifs sur les souches indicatrices et d'évaluer la sensibilité de ces souches. Elle consiste à déposer, sur une culture de germes indicateurs, des disques imbibés de produits, de solvants de récupération (témoins négatifs) et de produits de référence ou produits antimicrobiens (témoins positifs). La diffusion des produits sur le milieu peut inhiber la croissance des souches à tester. Pour les bactéries et la levure, une zone claire ou zone d'inhibition est perçue lorsque l'extrait est actif, la mesure du diamètre d'inhibition permet d'évaluer la sensibilité de ces germes. Quant aux champignons phytopathogènes, l'extrait est actif s'il y a arrêt de croissance de mycélium. La détermination du pourcentage d'inhibition de l'extrait permet d'estimer la sensibilité de ces souches. Le pourcentage d'inhibition est calculé par la formule suivante :

$$P (\%) = 100 - \left(\frac{T}{C} \times 100 \right)$$

Avec :

P (%) : pourcentage d'inhibition exercé par l'extrait sur le champignon phytopathogène.

T (mm) : rayon du mycélium du champignon phytopathogène face au disque imbibé d'extrait.

C (mm) : rayon du mycélium du champignon phytopathogène face au disque imbibé de solvant de récupération (témoin négatif).

La méthode de **microdilution** s'applique avec les extraits actifs lors du test par diffusion sur gélose, sur les bactéries et la levure. Elle est utilisée pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB). Cette méthode consiste à mettre en culture, sur milieux liquides, dans une microplaque à 96 puits, les souches de référence, en présence d'une gamme de concentrations d'extrait. En même temps, une culture seule des souches à tester est effectuée (témoin négatif). La turbidité de chaque puits est mesurée sous la lumière UV (630 nm), conduisant au calcul du taux d'inhibition. Les différents puits sont ensuite révélés avec un colorant vital (MTT) qui vire au bleu violacé lorsqu'il y a croissance des souches. La CMI correspond alors à la plus faible concentration d'extrait du puits qui a environ 100% de taux d'inhibition et qui ne se colore pas en bleu violacé. Quant à la CMB, elle correspond à la plus faible concentration d'extrait du puits où les germes sont tués, à partir de la CMI. Le taux d'inhibition est calculé par la formule suivante :

$$P (\%) = 100 - \left(\frac{T}{S} \times 100 \right)$$

Avec :

T (Croissance test) = D.O puits test – D.O puits témoin extrait.

S (Croissance témoin) = D.O puits témoin souche – D.O puits témoin milieu.

La méthode de **CCM-bioautographie directe** permet de déterminer la ou les fractions actives d'un extrait actif sur les souches correspondantes. C'est une méthode combinant la CCM et la croissance microbienne. Elle consiste d'abord à séparer les différents constituants de l'extrait, par migration sur une plaque de silice et dans un système d'éluant adéquat. Les différentes fractions sont révélées à la lumière UV (254 nm et 365 nm) et marquées. Une culture de la souche à tester est ensuite effectuée sur la plaque révélée. La préparation est enfin pulvérisée de colorant vital (MTT) qui vire au bleu violacé quand il y a croissance de souche. La présence de zone claire ou zone d'inhibition qui n'est pas colorée en bleu violacé, sur la plaque inoculée, indique la ou les fractions actives. Le rapport frontal (**Rf**) de chaque fraction est déterminé selon la formule :

$$Rf = \frac{Dt}{Dfr}$$

Avec :

Rf : Rapport frontal.

Dt : Distance parcourue par l'extrait à partir du dépôt.

Dfr : Distance du front du solvant de migration.

II-4-2- Matériels utilisés :

- Extraits de métabolites secondaires secrétés par les endophytes n°1867 et n°1918 :
 - extraits dichlorométhaniques,
 - extraits à l'acétate d'éthyle,
 - extraits méthanoliques.
- Les souches indicatrices (Annexe III):
- ✓ Bactéries à Gram négatif (-) :

Escherichia coli.

Pseudomonas aeruginosa.

Salmonella typhi.

- ✓ Bactéries à Gram positif (+) :

Bacillus subtilis.

Staphylococcus aureus.

Streptococcus faecalis.

- ✓ Souche de levure : *Candida albicans.*
- ✓ Souches de champignons phytopathogènes :

Colletotrichum gloeosporioides.

Fusarium oxysporium.

Guignardia sp.

Rhizoctonia solani.

- Les produits de références :
 - Chloramphénicol à 30 µg/ml.
 - Nystatine à 40 µg/ml.
- Disques de papier Whatman n°1.
- Microplaques à 96 puits.
- Plaque de silice F₁₅₀₀/SL₂₅₄.
- Milieux de culture :
 - solides : Agar nutritif (NA), Sabouraud solide (SAB solide),
Mueller Hinton solide (MHA), Potato dextrose agar (PDA)
 - liquides : Bouillon nutritif (NB), Sabouraud liquide (SAB liquide),
Mueller Hinton liquide (MHB).
- Colorant vital MTT.
- Solvants organiques :
 - hexane,
 - dichlorométhane (DCM),
 - acétate d'éthyle (AcOEt),
 - méthanol (MeOH).

Toutes les manipulations sont toujours faites sous hotte à flux laminaire et près de la flamme du bec bunsen.

II-4-3- Rajeunissement des souches :

Des souches indicatrices de bactéries, de levure et de champignons phytopathogènes sont conservées au laboratoire de microbiologie de l'IMRA. Pour chaque méthode, ces souches sont mises en rajeunissement.

II-4-3-1- Rajeunissement des champignons phytopathogènes :

Les champignons phytopathogènes sont repiqués sur du milieu PDA : un bout de mycélium de la souche conservée est repiqué contre le milieu de culture. L'incubation dure 72 heures à 25°C.

II-4-3-2- Rajeunissement des bactéries et levure :

Les bactéries sont repiquées en stries sur du milieu NA, à l'aide d'une anse stérile. Les cultures sont incubées à 37°C pendant 24 heures.

La levure est également ensemencée en stries mais sur du milieu SAB solide, avec une anse stérile. Elle est incubée à 25°C pendant 24 heures.

II-4-4- Méthode de diffusion sur gélose :

II-4-4-1- Avec des champignons phytopathogènes :

A partir des souches jeunes de champignons phytopathogènes, un bout de mycélium d'environ 1 cm² de chaque souche est prélevé à l'aide d'une anse stérile, puis déposé au centre du milieu PDA où la face du mycélium est mise contre le milieu. La culture est incubée à 25°C, pendant 48 heures.

Des disques stériles imbibés de 20 µl d'extraits ou de DMSO (témoin négatif) sont déposés à environ 2,5 cm des mycéliums de champignons phytopathogènes précédents. Chaque échantillon est réalisé en deux (2) exemplaires. Les boîtes sont incubées à 25°C jusqu'à ce que les mycéliums touchent les témoins négatifs. Les rayons des mycéliums sont ensuite mesurés et les taux d'inhibition sont calculés.

II-4-4-2- Avec des bactéries et de la levure :

a. Revivification des souches :

A partir d'une des cultures jeunes préparées précédemment, une à trois colonies isolées sont prélevées à l'aide d'une anse stérile, puis inoculées dans 50 ml de milieu MHB stérile pour les bactéries et SAB liquide pour *Candida albicans*. Les cultures sont incubées à 37°C ou à 25°C sous agitation à 50 tours/mn pendant 12 heures (overnight).

b. Préparation de l'inoculum :

A partir de la suspension microbienne de 12 heures précédente, quelques microlitres de cette suspension sont ajoutés à 3 ml de milieu MHB ou SAB liquide puis la turbidité de l'ensemble est mesurée à l'aide d'un densitomètre DENSICHECK jusqu'à avoir 0,5 Mcf, correspondant à 10^8 UFC/ml de bactéries et 10^7 UFC/ml de levure. Des dilutions de raison géométrique sont effectuées jusqu'à avoir 10^6 UFC/ml de germes.

c. Test :

Une culture en nappe est effectuée sur du milieu solide à partir de l'inoculum de 10^6 UFC/ml de germe puis séchée pendant 30 minutes. Des disques stériles imbibés de 20 μ l d'extrait, à une concentration de 20 mg/ml dilué dans du DMSO et de 20 μ l de DMSO (témoin négatif) sont déposés sur la culture en nappe sèche.

Une autre culture est réalisée mais utilisant cette fois-ci des produits de références : Chloramphénicol 30 μ g/ml pour les bactéries et Nystatine 40 μ g/ml pour la levure (comme témoins positifs). Les boîtes sont incubées à 37°C pour les bactéries et 25°C pour la levure pendant 24 heures. La présence de zone d'inhibition est observée et le diamètre d'inhibition est mesuré.

II-4-5- Méthode de microdilution :

II-4-5-1- Préparation de l'inoculum :

Le même protocole que lors de la préparation d'inoculum au cours de la méthode de diffusion sur gélose est adopté, c'est-à-dire une suspension microbienne de 10^6 UFC/ml est préparée à partir d'une culture revivifiée sur milieu liquide de souche rajeunie.

II-4-5-2- Test :

a. Distribution des échantillons :

Sur une microplaque à 96 puits et à partir de 20 mg/ml d'extrait actif (dilué dans du DMSO) ainsi que du DMSO, une série de 8 dilutions de raison géométrique (volume/volume : 100 μ l/100 μ l) est réalisée avec de l'eau distillée. Dans d'autres puits de la microplaque, 100 μ l d'eau distillée sont versées. Une concentration est versée dans 4 puits : 2 puits tests et 2 puits témoins extraits.

Sur cette même microplaque, 100 µl de la suspension microbienne de 10^6 UFC/ml de la souche à tester, préparés précédemment sont ajoutés dans 2 puits contenant la gamme de concentrations d'extrait actif (puits tests) et de DMSO (puits témoins souches). Dans les 2 autres puits restant, 100 µl de milieu liquide stérile correspondant à celui de l'inoculum sont ajoutés dans les puits contenant la série de concentration d'extrait (puits témoins extraits) et du DMSO (puits témoins milieux). Les concentrations finales d'extrait dans chaque puits sont 10 mg/ml ; 5 mg/ml ; 2,5 mg/ml ; 1,25 mg/ml ; 0,62 mg/ml ; 0,31 mg/ml ; 0,15 mg/ml et 0,08 mg/ml.

La répartition des différents échantillons dans chaque puits est représentée dans la figure 7 :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	T1	T1		TE1	TE1			TS1	TS1		TM1	TM1
B	T2	T2		TE2	TE2			TS2	TS2		TM2	TM2
C	T3	T3		TE3	TE3			TS3	TS3		TM3	TM3
D	T4	T4		TE4	TE4			TS4	TS4		TM4	TM4
E	T5	T5		TE5	TE5			TS5	TS5		TM5	TM5
F	T6	T6		TE6	TE6			TS6	TS6		TM6	TM6
G	T7	T7		TE7	TE7			TS7	TS7		TM7	TM7
H	T8	T8		TE8	TE8			TS8	TS8		TM8	TM8

Figure 7: Distribution des différents échantillons dans les différents puits d'une microplaque à 96 puits.

Avec :

T : Tests (100 µl d'extrait de différentes concentrations + 100 µl de suspension microbienne à 10^6 UFC/ml).

TE : Témoins Extraits (100 µl d'extrait de différentes concentrations + 100 µl de milieu de culture stérile).

TS : Témoins Souches (100 µl de DMSO de différentes concentrations + 100 µl de suspension microbienne à 10^6 UFC/ml).

TM : Témoins Milieux (100 µl de DMSO de différentes concentrations + 100 µl de milieu de culture MHB ou SAB liquide stérile).

b. Incubation :

La plaque contenant les différentes cultures est ensuite incubée à 37°C pour les bactéries et à 25°C pour *C. albicans* pendant 18 à 24 heures sous agitation (50 tours/min).

c. Lectures :

Après environ 24 heures d'incubation, les densités optiques de chaque culture dans les puits de la microplaque sont mesurées sous la lumière UV à une longueur d'onde de 630 nm. A partir de ces valeurs, les taux d'inhibition correspondant aux différentes concentrations de l'extrait sont calculés. La CMI correspond à la concentration minimale de l'extrait ayant un taux d'inhibition aux environs de 100%.

Sur la même microplaque, 40 µl de MTT à 0,2 mg/ml sont distribués dans les différents puits tests et témoins. La plaque est ensuite incubée pendant 10 à 30 minutes à 30°C. L'apparition de la coloration bleu violacé est observée et notée. La concentration minimale d'extrait contenue dans les puits qui ne sont pas colorés en bleu-violet par le MTT correspond à sa CMI.

Pour la CMB, 20 µl des cultures des puits ayant environ 100% d'inhibition sont ensemencées sur un milieu solide puis incubées pendant 24 heures à 37°C pour les bactéries et à 25°C pour *C. albicans*. La concentration minimale de l'extrait, où il n'y a pas de germes qui poussent sur le milieu, correspond à la CMB.

II-4-6- Méthode de CCM-bioautographie directe :

II-4-6-1- Mise au point de la CCM :

Les extraits secs actifs sont récupérés dans des solvants organiques correspondant à ceux de leur extraction (exemple : méthanol pour un extrait méthanolique). L'extrait est concentré à 10 mg/ml et le volume de dépôt est de 10 μ l.

Sur une plaque de silice F₁₅₀₀/ SL₂₅₄, 10 μ l de l'extrait à 10 mg/ml sont déposés sur la ligne de dépôt. La plaque est ensuite placée dans une cuve chromatographique CAMAG contenant 20 ml de système de solvants de migration. Les systèmes de solvant de migration utilisés sont : Hexane/AcOEt : [1/1] ; [9/1] ; [7/1] ; [5/1] ; [3/1] ; [2/1] ; [3/2].

La plaque est enlevée de la cuve lorsque la migration arrive à 1 cm du bord supérieur de la plaque (Figure 8). Elle est ensuite séchée.

La plaque est révélée à la lumière UV aux longueurs d'onde de 254 nm et 365 nm et les différentes bandes observées sont marquées. Le rapport frontal de chaque fraction est calculé.

La figure 8 est un schéma d'une plaque de CCM.

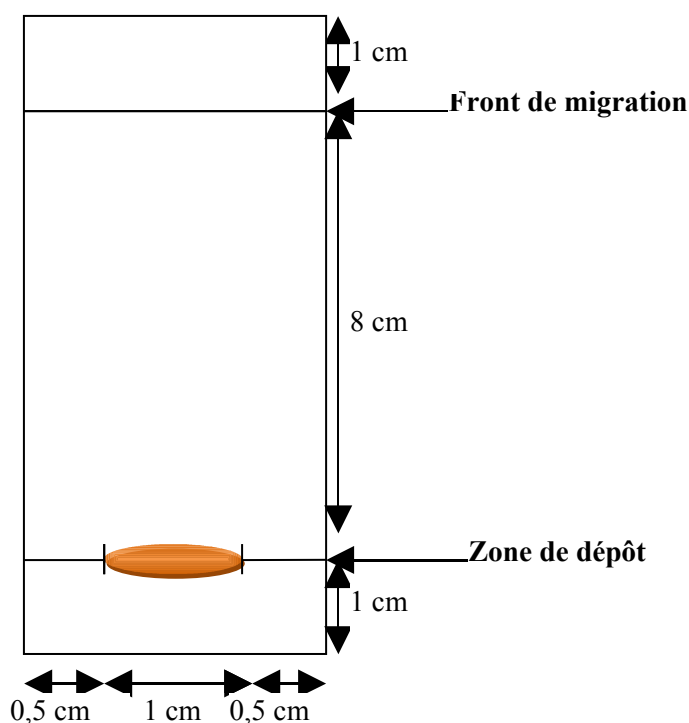


Figure 8 : Schéma d'une plaque de CCM.

II-4-6-2- Inoculation de la plaque :

Une culture microbienne de 24 heures de la souche de référence à tester est effectuée sur un milieu liquide correspondant à la souche (NB ou SAB liquide). Cette suspension (1 ml) est ajoutée dans 20 ml de milieu NA ou SAB solide liquéfié, maintenu à 45°C, puis le mélange est agité. La culture microbienne sur milieu solide liquéfié est versée sur la plaque préalablement préparée et révélée. La couche de culture sur la plaque est très fine. La préparation est incubée pendant 24 heures dans une atmosphère humide, à 37°C pour les bactéries et à 25°C pour *C. albicans*.

II-4-6-3- Lecture :

Après 24 heures d'incubation, la plaque inoculée de culture microbienne est pulvérisée de colorant vital MTT à 0,2 mg/ml puis incubée pendant 10 à 30 minutes à 30°C. La présence de zone claire ou zone d'inhibition (zone qui n'est pas colorée en bleu violacé) est observée et le rapport frontal est calculé.

II-4-7- Résultats :

II-4-7-1- Méthode de diffusion sur gélose :

a) Avec des champignons phytopathogènes :

Au bout de 96 heures, les mycéliums des phytopathogènes touchent le bord du disque témoin.

La croissance de *Fusarium oxysporum*, *Guignardia sp* et *Rhizoctonia solani* n'est pas inhibée par les 24 extraits. Ces 24 extraits n'ont pas d'activité sur ces souches.

Les extraits issus des cultures par fermentation du champignon n°1918 et les extraits dichlorométhaniques et méthanoliques du champignon n°1867 n'arrêtent pas la croissance de *Colletotrichum gloeosporioides*. Seuls les extraits à l'acétate d'éthyle du champignon n°1867 (7, 8, 19 et 20) inhibent la croissance radiale du mycélium de ce champignon phytopathogène (Figure 9).

Les taux d'inhibition de *C. gloeosporioides* sont dressés dans le tableau 4 :

Tableau 4: Diamètres et pourcentages d'inhibition de *C. gloeosporioides* par les extraits à l'acétate d'éthyle issus du champignon n°1867.

Disque imbibé de (*)	Diamètre de mycélium	Taux d'inhibition
DMSO (témoin négatif)	25 mm	
extrait 7	16 mm	36%
extrait 8	17,5 mm	30%
extrait 19	15 mm	40%
extrait 20	16 mm	36%

* Concentration des extraits = 20 mg/ml.

Volume de dépôt dans chaque disque = 20 μ l.

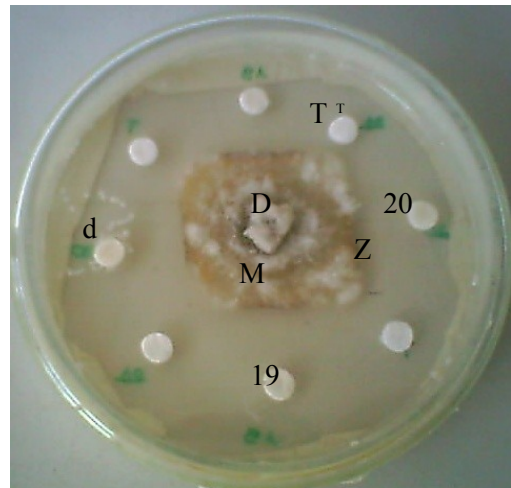
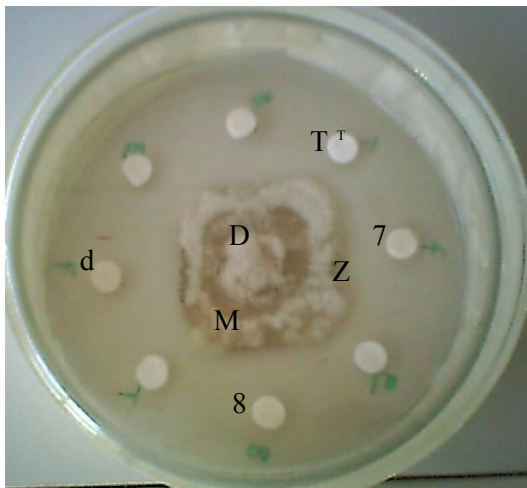


Figure 9: Inhibition de *Colletotrichum gloeosporioides* par les extraits 7, 8, 19 et 20.

Avec :

D : dépôt de mycélium de *C. gloeosporioides*.

- d : disque imbibé d'extrait.
M : mycélium de *C. gloeosporioides*.
T : disque imbibé de DMSO (témoin négatif).
Z : zone d'inhibition

b) Avec des bactéries et levure :

Après 24 heures d'incubation, les observations montrent qu'il y a la présence d'une zone d'inhibition autour de certains disques imbibés par les extraits à 20 mg/ml sur *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Salmonella typhi* et *Candida albicans* (Figure 10). Par contre, aucune zone d'inhibition n'est observée autour des disques imbibés d'extraits testés sur *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Seuls les extraits qui ont un diamètre d'inhibition égal à 9,5 mm tels que l'extrait 17 sur *Bacillus subtilis*; les extraits 22 et 24 sur *Staphylococcus aureus*; l'extrait 22 sur *Streptococcus faecalis*; les extraits 2, 23 et 24 sur *Salmonella typhi* et l'extrait 11 sur *Candida albicans* sont notés. Ce sont donc ces extraits qui vont faire l'objet de la suite de cette étude. Les diamètres d'inhibition des extraits sont représentés dans le tableau 5 :

Tableau 5 : Diamètres d'inhibition (mm) des bactéries à Gram positif, de *Salmonella typhi* et de *Candida albicans*.

Extraits (*)	Souches <i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. foecalis</i>	<i>S. typhi</i>	<i>C. albicans</i>
1	8	7	0	0	8
2	0	9	9	9,5	8,5
3	0	7	7,5	0	0
4	0	8,5	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	7	7	0	8,5	0
7	7	0	0	8,5	9
8	0	0	0	0	8
9	7	8,5	0	0	8
10	0	8	0	8,5	9
11	0	9	0	0	9,5
12	0	7,5	0	8,5	8
13	7	8,5	0	0	0
14	0	9	7	7	0
15	0	8,5	0	7,5	0
16	0	9	0	0	0
17	9,5	0	0	9	0
18	7,5	0	0	7	0
19	7	0	0	0	0
20	7	0	0	0	0
21	0	0	0	0	8,5
22	0	9,5	9,5	0	0
23	0	0	0	9,5	0
24	7	9,5	0	9,5	0
Chloramphénicol (30 µg/ml)	20,5	19	17,5	23	-
Nystatine (40 µg/ml)	-	-	-	-	20

* Concentration des extraits = 20 mg/ml.

Volume de dépôt dans chaque disque = 20 µl.

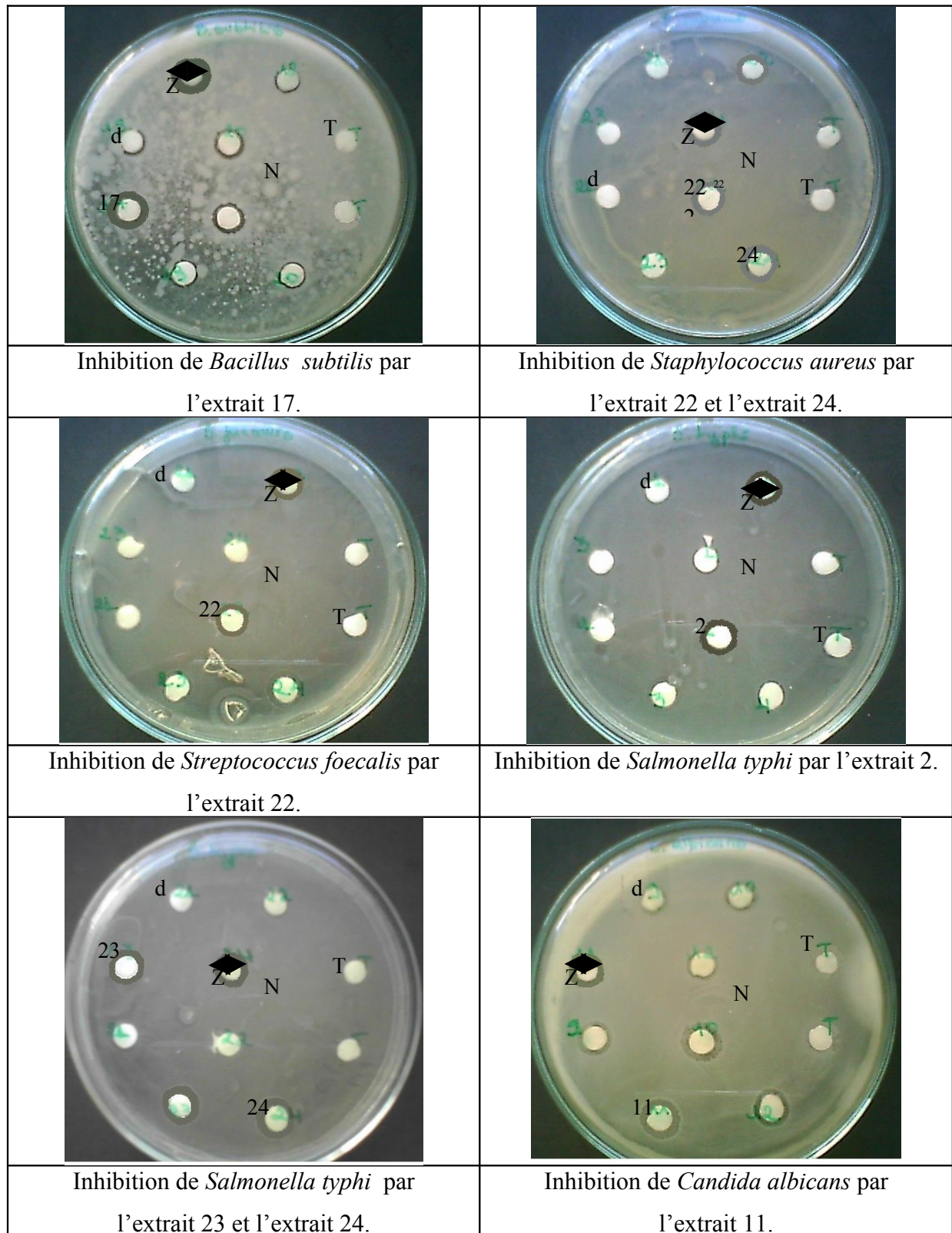


Figure 10 : Inhibitions des souches de bactéries et levure par les extraits.

Avec :

d = disque imbibé d'extrait.

T = disque imbibé de DMSO (témoin négatif).

N = nappe de culture microbienne.

Z = diamètre de zone d'inhibition.

II-4-7-2- Méthode de microdilution :

Après la lecture des densités optiques des échantillons contenus dans chaque puits, sous lumière UV à la longueur d'onde de 630 nm, les taux d'inhibition correspondant à chaque concentration d'extrait sont de 0% pour les extraits 2, 23 et 24 sur *Salmonella typhi* et l'ajout de MTT dans les puits induit à une coloration bleu violacé. Ce même cas est observé pour l'extrait 24 sur *Staphylococcus aureus* et l'extrait 22 sur *Streptococcus faecalis*.

D'autres extraits inhibent la croissance des souches de *B. subtilis*, *S. aureus* et *C. albicans*. Les pourcentages d'inhibition de ces souches et la révélation avec du MTT sont représentés dans le tableau 6 :

Tableau 6 : Pourcentages d'inhibition de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* et révélations avec du MTT :

Souches	<i>B.subtilis</i>		<i>S.aureus</i>		<i>C.albicans</i>	
Extraits	17		22		11	
Concentration (mg/ml)	%	MTT	%	MTT	%	MTT
10	108	-	15,34	+	29,85	+
5	102,3	-	8,13	+	12,57	+
2,5	91,3*	-	0	+	9,09	+
1,25	46,2	+	0	+	8,09	+
0,62	25	+	0	+	0	+
0,31	0	+	0	+	0	+
0,15	0	+	0	+	0	+
0,08	0	+	0	+	0	+

(*) CMI

(+) coloration bleu violacé

(-) pas de coloration bleu violacé

Volume de dépôt d'extrait ou de suspension microbienne dans chaque puits = 100 µl (v/v).

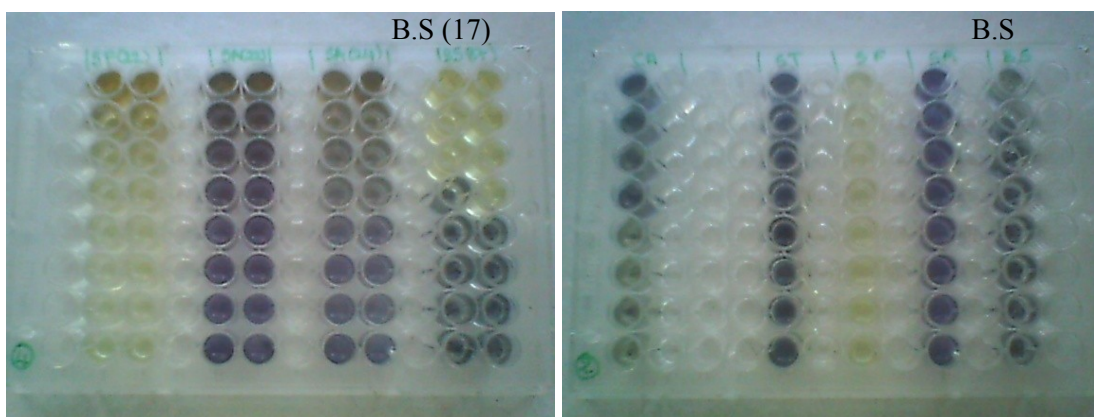


Figure 11: Microplaques contenant l'inhibition de *Bacillus subtilis*
(à gauche : croissance test, à droite : croissance témoin).

Avec :

B.S (17) : extrait 17 testé sur *Bacillus subtilis*

B.S : croissance seule de *Bacillus subtilis*.

L'ensemencement sur milieu NA de 20 μ l de culture de *B. subtilis* contenus dans chaque puits correspondant à 2,5 mg/ml jusqu'à 10 mg/ml de l'extrait 17, suivi d'une incubation de 24 heures à 37°C résulte la croissance de *B. subtilis*. La CMB de l'extrait 17 sur ce germe est supérieure à 10 mg/ml.

Il est à noter que l'extrait 17 et *Bacillus subtilis* sont utilisés pour la suite de cette étude.

II-4-7-3- Méthode de CCM-bioautographie directe :

a) Mise au point de la CCM :

Après révélation des plaques sous la lumière UV aux longueurs d'onde de 254 nm et 365 nm, les différentes bandes de l'extrait 17 sont plus ou moins séparées dans le système de solvant de migration hexane/acétate d'éthyle [3/1] par rapport aux autres systèmes. Le chromatogramme de l'extrait 17 est montré dans la figure 12.

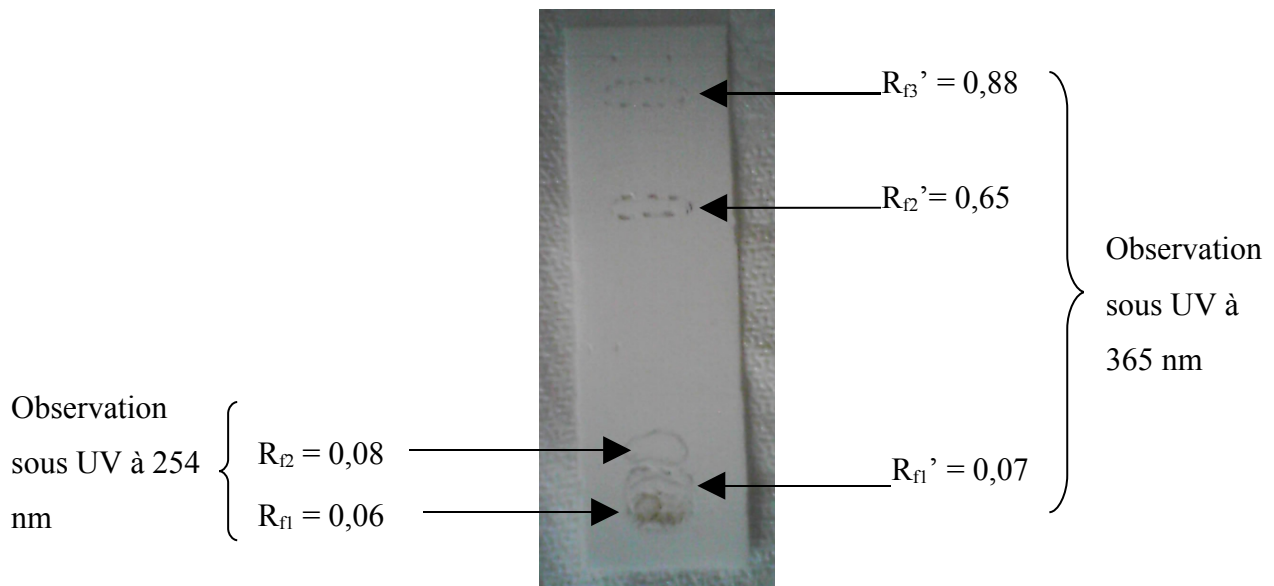
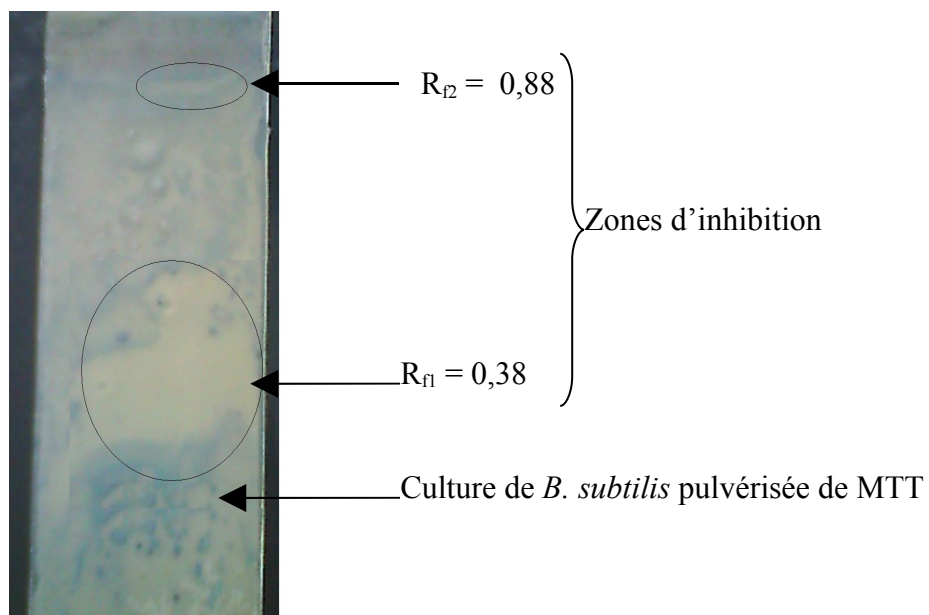


Figure 12: Chromatogramme de l'extrait 17 après observation sous la lumière UV avec les rapports frontaux des bandes.

b) Révélation avec le colorant vital MTT :

Après incubation pendant 24 heures de la plaque de CCM de l'extrait 17, recouverte de culture inoculée de *Bacillus subtilis*, elle est pulvérisée par une solution de MTT à 0,2 mg/ml. Des zones claires sont observées sur un fond bleu violacé correspondant à des zones d'inhibitions situées à des références frontales distinctes de 0,38 (situé entre 2 cm et 4,1 cm de la zone de dépôt) et 0,88 (Figure 13).



***Figure 13* :** Chromatogramme de l'extrait 17, couverte de culture de *Bacillus subtilis*, pulvérisé de MTT.

II-5- CINQUIEME ETAPE : CRIBLAGE CHIMIQUE DES EXTRAITS ACTIFS.

Cette dernière étape a pour objectif de déterminer la nature chimique des composants de l'extrait actif (extrait 17 actif sur *Bacillus subtilis*) et de ses fractions actives par la méthode colorimétrique sur CCM.

II-5-1- Principe :

La méthode de colorimétrie sur CCM est une méthode permettant de séparer les différents composés d'un produit et d'identifier la nature chimique de ses composants en utilisant des réactifs spécifiques. Elle consiste d'abord à séparer les différentes fractions d'un extrait sur une plaque de silice dans un système d'éluant adéquat. Les différentes fractions sont ensuite révélées à la lumière UV aux longueurs d'onde de 254 nm et 365 nm puis marquées sur la plaque avec leur référence frontale respective. La nature des différentes fractions actives est ensuite révélée avec des réactifs chimiques spécifiques comme l'anisaldéhyde sulfurique à 5% qui détecte les terpènes et les saponines, le réactif de Dragendorff qui justifie la présence des alcaloïdes, la solution éthanolique de KOH à 5% qui discerne les dérivées anthracéniques et les coumarines et la solution de NP/PEG qui démontre la présence des flavonoïdes.

II-5-2- Matériels utilisés :

- Extrait à l'acétate d'éthyle 17,
- Plaque de silice F₁₅₀₀/SL₂₅₄,
- Solvants organiques : hexane et acétate d'éthyle,
- Réactifs pour le traitement chimique (Annexe VII) :
 - Solution d'anisaldéhyde sulfurique à 5%
 - Réactif de Dragendorff,
 - Solution éthanolique de KOH à 5%,
 - Solution de NP/PEG.

II-5-3- Préparation de la plaque de CCM :

Un volume de 10 µl de l'extrait 17 à 10 mg/ml dilué dans de l'acétate d'éthyle est déposé sur la ligne de dépôt de la plaque. La plaque est placée dans une cuve

chromatographique CAMAG contenant 20 ml d'éluant hexane/acétate d'éthyle [3/1] (le système qui a été mis au point lors du test antimicrobien par la méthode de CCM-bioautographie directe). Dès que le front de solvant arrive à 1 cm du bord supérieur de la plaque celle-ci est retirée de la cuve puis séchée. Les différentes bandes sont ensuite révélées à la lumière UV aux longueurs d'onde de 254 nm et 365 nm et les références frontales sont calculées. Quatre plaques sont préparées dans les mêmes conditions.

II-5-4- Révélation :

La plaque préparée précédemment subit des traitements pour la détection de la nature chimique de ces différentes fractions.

- **Détection des terpènes :**

La plaque est pulvérisée par une solution d'anisaldéhyde sulfurique à 5% puis chauffée à l'étuve à 120°C pendant 15 minutes. La présence d'une coloration bleu, bleu vert, rouge marron ou rouge violet ou violet ou jaunâtre sur les fractions est observée. Ces colorations déterminent la présence de terpènes et de saponines.

- **Détection des alcaloïdes :**

Le réactif de Dragendorff est pulvérisé sur la plaque. L'observation directe d'une coloration marron ou orange des fractions révèle la présence d'alcaloïdes.

- **Détections des dérivées anthracéniques et des coumarines :**

La plaque est révélée par une solution éthanolique de KOH à 5% puis à la lumière UV à la longueur d'onde de 365 nm. L'apparition des colorations rouge ou jaune fluorescent et bleu fluorescent démontrent respectivement la présence de dérivées anthracéniques et de coumarines.

- **Détection des flavonoïdes :**

La solution de NP/PEG est pulvérisée sur la plaque, puis après environ 15 minutes, la préparation est observée sous une lumière UV à 365 nm de longueur d'onde. L'observation d'une fluorescence jaune ou verte sur les fractions marque la présence des flavonoïdes.

II-5-5- Résultats :

Après les révélations de chaque plaque par les réactifs chimiques spécifiques, les observations de la couleur des fractions sont dressées dans le tableau 7 :

Tableau 7 : Composition chimique de l'extrait 17.

Familles chimiques	Réactifs spécifiques	Extrait 17	Colorations	Rf
TERPENES	Anisaldéhyde sulfurique à 5%	+	Bleu	0,06
				0,125
				0,25*
				0,35*
			Vert	0,51*
				0,07
				0,31*
				0,48*
				0,88*
ALCALOIDES	Réactif de Dragendorff	-	Pas de coloration rouge marron	
DERIVEES ANTHRACENIQUES	Solution éthanolique de KOH à 5%	+	Vert jaune et rouge brique	0,07
COUMARINES				0,21
		+	Bleu fluorescent	0,65
FLAVONOIDES	Solution de NP/PEG	+	Vert jaune	0,08

* fractions actives sur *Bacillus subtilis*.

En comparant le chromatogramme de la bioautographie directe de l'extrait 17 sur *B. subtilis* et celui révélé avec de l'anisaldéhyde sulfurique à 5%, il est constaté que pour la zone d'inhibition dont le $R_f = 0,38$, celle-ci est causée par 5 fractions bien nettes dont les R_f sont : 0,25 ; 0,31 ; 0,35 ; 0,48 ; 0,51. Ces fractions sont colorées en bleu ou en vert. Les fractions actives de cet extrait sur *B. subtilis* sont des terpènes (Tableau 7).

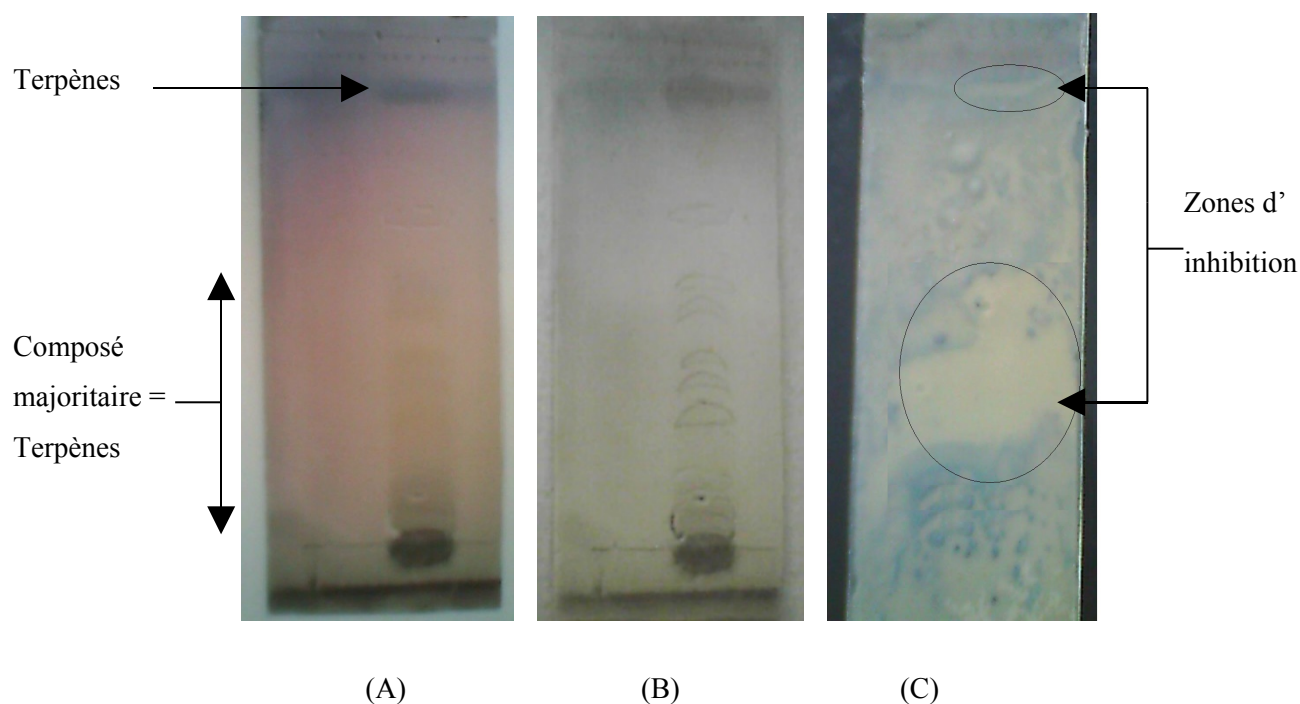


Figure 14: Chromatogrammes après révélation avec de l'anisaldéhyde sulfurique à 5% avec des fractions non marquées (A), marquées (B) et la bioautographie de l'extrait 17 testé sur *Bacillus subtilis* (C).

PARTIE III :
INTERPRETATIONS
ET
DISCUSSION

III-1- Test préliminaire – dualité culturale :

Au cours de cette étape préliminaire, 115 souches de champignons endophytes de *Pothos scandens* sont testées, par dualité culturale, sur 4 champignons phytopathogènes indicateurs. Seuls deux souches de champignons endophytes : n°1867 (isolée des tiges) et n°1918 (isolée des feuilles) sont capables d'inhiber, en même temps, la croissance de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Guignardia sp.* et *Rhizoctonia solani* (Figure 3).

L'inhibition de la croissance de ces champignons phytopathogènes se caractérise par l'arrêt du développement de leur mycélium face aux champignons endophytes. Les champignons qui sont en culture sont capables de synthétiser des produits de différentes natures et structures comme des fongicides [36]. L'arrêt de la croissance des mycéliums des champignons indicateurs face à ces champignons endophytes serait probablement dû aux produits sécrétés par ces endophytes dans les milieux.

Les taux d'inhibition des champignons indicateurs face aux deux endophytes varient de 22,22% à 47,77% (Tableau 2). Cette variation du taux d'inhibition montre les différentes sensibilités de ces champignons phytopathogènes aux produits sécrétés par les endophytes, comme le cas de *C. gloeosporioides* qui est plus sensible au champignon endophyte n°1867 et inhibé à 47,77% (Tableau 2). Cette variation montre également la différence probable entre les produits sécrétés par les endophytes n°1867 et n°1918. Par exemple, les produits de n°1867 et de n°1918 inhibent respectivement à 33,33% et 22,22% la croissance du mycélium de *Fusarium oxysporum*. Non seulement les champignons sont capables de synthétiser et de sécréter des produits, mais ces produits diffèrent d'un champignon à un autre et peuvent avoir différentes propriétés.

III-2- Production de métabolites secondaires :

Au cours de cette étape de production de métabolites secondaires, deux champignons endophytes n°1867 et n°1918 de *Pothos scandens* sont sélectionnés à l'issue du test préliminaire. Des cultures par fermentation de ces champignons sur milieux liquides PDB et OB sont effectuées. Au bout de 6 semaines, aucun signe de contamination n'est observé et une masse importante de mycélium est obtenue (Figure 5).

Les cultures par fermentation adoptées sont des cultures continues c'est-à-dire dans un système isolé où il n'y a pas de renouvellement de milieu de culture ou de substrat. Ces cultures permettent de minimiser les risques de contaminations qui altèrent la qualité de la culture et réduisent l'optimisation de la production des biomasses [54]. Les différentes conditions de stérilité sont respectées durant toutes les manipulations. Les cultures sont alors exemptes de contaminations qui peuvent provenir des surfaces de travail, du manipulateur, de l'environnement. Le système de culture continue adopté permet également d'éviter les problèmes d'inhibitions de la croissance causés par l'excédant de substrat [45].

Plusieurs paramètres peuvent conditionner la croissance des champignons tels que la composition du substrat, le pH, la température, l'oxygénation et le temps d'incubation. Les champignons exigent dans leur substrat des sources de carbone et d'azote. Les deux milieux utilisés PDB et OB contiennent de l'extrait de levure et sont respectivement composés de sucres, de pommes de terre, et des flocons d'avoine qui apportent aux champignons un apport suffisant en carbone et en azote pour leur croissance. Puisque le pH optimal de croissance des champignons est entre 5 à 6, celui des milieux de culture PDB et OB est ajusté à 5,6. La température convenable pour les champignons est entre 20°C à 30°C [54] ; celle-ci est proche de la température ambiante où la culture est incubée. Un apport suffisant en oxygène et une agitation sont nécessaires, permettant d'augmenter la surface d'échange et d'intensifier, en conséquence, la vitesse de croissance de ces champignons [17]. L'ajout d'inducteurs (CuSO_4 et ZnSO_4) permet d'amplifier la production de métabolites secondaires car ces inducteurs déstabilisent les souches en culture qui produisent des métabolites secondaires dans des conditions de stress.

Pour le temps d'incubation, il est important de suivre l'évolution de la culture. Les masses de champignons n°1867 et 1918 dans les fermenteurs sur milieux PDB et OB sont considérables et atteignent leur apogée après 6 semaines d'incubation. Macroscopiquement, la quantité de mycéliums dans chaque culture par fermentation est stable après ces 6 semaines, ce qui indique que la phase de croissance stationnaire est atteinte. Comme les cultures se déroulent dans un système isolé, l'apport en élément nutritif est épuisé et certains paramètres de croissances sont modifiés comme le pH qui devient acide après la formation de CO_2 et des acides organiques au cours de la phase de croissance exponentielle [54]. Les conditions de culture ne sont plus favorables à la croissance des champignons donc ils ne se développent plus.

Les champignons endophytes mis en culture produisent alors des substances dites métabolites secondaires qui sont synthétisées au début et pendant la phase stationnaire. Contrairement aux métabolites primaires qui sont des produits utilisés par les champignons pour se développer, les métabolites secondaires sont des produits non indispensables à leur croissance. Ils sont de différentes natures. L'incubation des cultures est prolongée de 2 semaines. Le temps d'incubation total est alors de 8 semaines. Cette prolongation permet de placer les champignons dans des conditions défavorables et de rallonger la phase stationnaire afin d'avoir suffisamment de métabolites secondaires.

III-3- Extraction des métabolites secondaires issus des champignons endophytes de *P. scandens* :

Après 8 semaines d'incubation, les métabolites secondaires synthétisés par les champignons endophytes n°1867 et n°1918 sont extraits des cultures par fermentation sur PDB et sur OB, par la méthode d'extraction en cascade avec des solvants organiques à polarité ascendante. Chaque culture est alors séparée en deux phases, les filtrats de culture et les mycéliums subissent séparément, divers traitements physiques et chimiques. Des extraits dichlorométhaniques, à l'acétate d'éthyle et méthanoliques sont obtenus. La méthode d'extraction utilisée permet donc d'obtenir la quasi-totalité des métabolites secondaires. De plus, la séparation de la culture et les différents traitements utilisés facilitent la récupération des produits synthétisés par les champignons endophytes.

Les poids des extraits obtenus varient selon leur source. Ils varient d'un solvant à un autre, d'un champignon à un autre et d'un substrat à un autre. Par exemple, le poids de l'extrait dichlorométhanique issu de la culture du champignon n°1918 sur PDB (extrait 1) est de 206,4 mg et celui obtenu de la même souche sur OB (extrait 2) est de 331,1 mg (Tableau 3).

La quantité de produits extraits dans les solvants organiques apolaire (DCM et AcOEt) et polaires (MeOH) dépend alors de l'affinité et de la solubilité de ces métabolites dans ces solvants. Il est à remarquer que dans la majorité des cas, les poids des extraits méthanoliques obtenus sont supérieurs à ceux des extraits dichlorométhaniques et ceux des extraits à l'acétate d'éthyle sont les plus faibles (Tableau 3). Les métabolites secondaires polaires

solubles sont plus élevés que ceux apolaires. Les deux champignons endophytes synthétisent donc plus de métabolites polaires qu'apolaires.

Cette quantité dépend également de la qualité de la culture par fermentation. Plus la quantité de champignons actifs est importante, plus la quantité de métabolites secondaires extraits est élevée. La quantité de biomasses actives est donc un des paramètres d'optimisation de la production de métabolites secondaires. La différence de poids des métabolites secondaires extraits des deux milieux de culture n'est pas très nette. Il serait probable que les deux milieux utilisés, PDB et OB, sont convenables pour ces champignons endophytes n°1867 et n°1918, car différents extraits de métabolites secondaires sont obtenus.

III-4- Tests d'activité antimicrobienne :

Tous les extraits dichlorométhaniques, méthanoliques et les extraits à l'acétate d'éthyle des métabolites secondaires issus des champignons endophytes n°1867 et n°1918 de *Pothos scandens* sont testés sur des champignons indicateurs, des bactéries et une levure indicatrices.

III-4-1- Méthode de diffusion sur gélose :

Les extraits à tester sont dilués dans du DMSO et concentrés à 20 mg/ml. Le volume du dépôt dans chaque disque est de 20 µl. La quantité d'extrait contenue dans chaque disque équivaut alors à 400 µg.

Pour le cas des champignons filamenteux, après 96 heures d'incubation, seuls les extraits à l'acétate d'éthyle issus des cultures du champignon n°1867 présentent des zones d'inhibition autour de leurs disques (Figure 9), avec un taux d'inhibition entre 30% et 40% (Tableau 4) sur *Colletotrichum gloeosporioides*. Par contre, tous les extraits testés ne montrent pas de zone d'inhibition autour de leurs disques sur *Fusarium oxysporum*, *Guignardia sp* et *Rhizoctonia solani*. Ils ne sont donc pas actifs sur ces champignons phytopathogènes. Seuls les extraits 7, 8, 19 et 20 sont actifs sur *Colletotrichum gloeosporioides*.

Pour le cas des bactéries, aucune zone d'inhibition n'est observée autour des disques imbibés de tous les extraits testés sur les bactéries à Gram négatif *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. Tous les extraits ne sont donc pas actifs sur ces bactéries. Par

contre, certains extraits à l'acétate d'éthyle et méthanoliques sont actifs sur les bactéries à Gram positif (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus faecalis*), sur *Salmonella typhi*, et sur *Candida albicans* (Figure 10). Les diamètres d'inhibition mesurés se situent entre 7 mm à 9,5 mm (Tableau 5).

Dans les deux cas, le témoin négatif DMSO n'a pas de zone d'inhibition autour de son disque, sur tous les germes testés (Figure 5). Par contre, les témoins positifs montrent des zones d'inhibition plus importantes sur les germes respectifs.

La méthode de diffusion sur gélose permet de démontrer si un extrait est actif ou non, par l'observation des zones d'inhibition autour de disques. L'extrait imprégné dans les disques se propage sur la gélose de façon radiale inhibant ainsi la croissance des germes représentée sous forme de zone claire (ou zone d'inhibition) sur la culture microbienne. Elle permet également de déterminer la sensibilité d'une souche à un extrait donné par le calcul du taux d'inhibition correspondant à ces zones (cas des champignons filamenteux) ou par la mesure des diamètres de ces zones d'inhibition (cas des bactéries et levure). La sensibilité du germe à l'égard de l'extrait est d'autant plus importante que le taux d'inhibition et le diamètre de la zone d'inhibition sont grands [31].

Le DMSO est utilisé pour dissoudre les extraits bruts, il est une solution de rechange aux solvants organiques [21]. Il est choisi car certains solvants organiques ont une activité sur les souches, ce qui rend la lecture des résultats, difficile. Au cours de ce test, le DMSO n'est pas actif sur les germes. Son utilisation est alors justifiée.

Les extraits actifs au cours de cette méthode sont les extraits à l'acétate d'éthyle pour *Colletotrichum gloeosporioides* et les extraits à l'acétate d'éthyle et méthanoliques pour certaines bactéries (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* et *Salmonella typhi*) et pour *Candida albicans*. Les métabolites secondaires actifs capables d'inhiber la croissance de ces germes sont vraisemblablement solubles dans ces solvants organiques. De plus, pour *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Salmonella typhi* et *Candida albicans*, ces métabolites sont présents dans le filtrat de culture.

Les extraits actifs qui sont diffusés sur la gélose sont en contact direct avec les souches sensibles au niveau de la paroi cellulaire. Cette paroi assure la perméabilité sélective des cellules et sa structure est différente selon les germes (Annexe VI). Pour les bactéries, elle est formée principalement de peptidoglycanes. Pour les bactéries à Gram négatif, elle est

formée de trois couches avec une couche externe composée d'un complexe lipopolysaccharides, phospholipides et protéines. Cette couche est une barrière sélective. Elle est la première à être contact avec les substances et conditionne les échanges cellulaires en éliminant davantage les facteurs qui pourraient nuire à la cellule. Chez les bactéries à Gram négatif, comme pour le cas d'*Escherichia coli* et de *Pseudomonas aeruginosa*, c'est probablement cette structure de leur paroi cellulaire qui rend ce groupe de bactéries insensible et les extraits inactifs, à l'exception de *Salmonella typhi* où la sensibilité aux extraits 2, 23 et 24 pourrait être due à l'inhibition des autres fonctions vitales de la cellule. Les bactéries à Gram positif et *Candida albicans* ne possèdent pas cette structure, ce qui les rend peut être plus sensible à certains extraits. La paroi des bactéries à Gram positif est formée en grande partie de peptidoglycanes. Celle de *Candida albicans* (champignon unicellulaire) est composée en majorité de polysaccharides, de protéines, de lipides et de sels minéraux. L'enveloppe des champignons filamenteux est comparable à celle des levures. Ce groupe n'est pas plus vulnérable, comme les levures, à certains produits à cause de leur structure cellulaire plutôt complexe et rigide.

III-4-2- Méthode de microdilution :

Les extraits les plus actifs lors du test d'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur gélose sont utilisés pour la détermination de leur CMI et de leur CMB sur les germes sensibles correspondants.

Après le calcul de taux d'inhibition et la révélation avec le MTT, parmi les extraits testés sur les germes sensibles utilisés, seule la valeur de la CMI de l'extrait 17 (extrait à l'acétate d'éthyle issu du filtrat de culture du champignon endophyte n°1918 sur PDB) sur *Bacillus subtilis* est déterminée. Cette CMI de l'extrait 17 sur *Bacillus subtilis* est égale à 2,5 mg/ml et la CMB est supérieure à 10 mg/ml auxquelles le taux d'inhibition est aux environs de 100% et le MTT ne vire plus au bleu violacé (Figure 11). Quant aux autres extraits sur les autres germes sensibles, les valeurs de taux d'inhibition se situent entre 8,09% à 29,85% et sont largement inférieur à la CMI (à environ 100%). La révélation à l'aide du MTT les confirme par leur virage au bleu violacé (Tableau 6).

La méthode de microdilution est réalisée afin de déterminer la CMI et la CMB de ces extraits actifs, mais surtout de confirmer l'activité de ces extraits sur les germes au cours de la

méthode de diffusion sur gélose. Cette dernière est parfois trompeuse car l'effet antimicrobien marqué lors de cette pratique peut être altéré par les facteurs extrinsèques comme les éventuelles contaminations, la taille des molécules de l'extrait étudié [33]. Cette méthode permet alors de mettre en contact direct, sans support, les germes et l'extrait dans un même milieu. Elle permet également d'évaluer l'inhibition de la croissance des germes sensibles face aux extraits actifs par le calcul des taux d'inhibition et de les confirmer visuellement en utilisant le MTT. Ce dernier est utilisé pour indiquer une activité biologique. Ses composés incolores agissent comme des accepteurs d'électrons. Ils sont réduits au niveau des mitochondries des microorganismes biologiquement actifs et se colorent. C'est pour cela qu'il vire au bleu violacé lorsqu'une croissance microbienne est détectée [16]. Son utilisation est alors plus simple et plus pratique. Il est préférable d'utiliser les deux pratiques en même temps (lecture sous lumière U.V à 630 nm et utilisation du MTT) pour situer exactement la CMI et pour confirmer les résultats.

Pour les valeurs les plus faibles de la CMI ou de la CMB, elles sont associées aux extraits les plus actifs [47]. La CMI est aussi un paramètre de l'effet bactériostatique de l'extrait. Elle correspond à la concentration minimale d'extrait qui inhibe la croissance du germe et la CMB est la concentration minimale d'extrait qui tue les germes, après une période de 18 heures à 24 heures d'incubation [15]. Dans le cas de l'extrait 17 sur *Bacillus subtilis*, l'extrait inhibe à presque 100% la croissance de *Bacillus subtilis* à 2,5 mg/ml, concentration correspondant à sa CMI, mais il ne tue les germes qu'à une concentration supérieure à 10 mg/ml. La valeur de la CMB n'est pas forcément égale à celle de la CMI même si leur taux d'inhibition est supérieur ou égale à 100% et le MTT ne vire pas au bleu violacé. Quoique dans certains cas la valeur de la CMB peut être égale à la CMI.

III-4-3- Méthode de CCM-bioautographie directe :

A l'issue des tests d'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur gélose et par la méthode de microdilution, l'extrait à l'acétate d'éthyle 17 est testé sur *Bacillus subtilis* par la méthode de CCM-bioautographie directe.

Après observation du chromatogramme sur une plaque de silice (F₁₅₀₀/SL₂₅₄) de l'extrait 17 et parmi les différents solvants de migration utilisés, seul le système d'éluant hexane/acétate d'éthyle [3/1] permet de séparer nettement les 5 bandes de l'extrait

qui se situent à des R_f différents (Figure 12). La séparation par CCM des différents constituants de l'extrait est en fonction du support de silice et du solvant de migration utilisés. L'extrait migre tout le long du support, entraîné par l'éluant. Les différentes fractions sont observées sous forme de bandes qui émettent des fluorescences lorsqu'elles sont observées à la lumière UV aux longueurs d'onde de 254 nm et 365 nm. Ces bandes s'arrêtent à des positions différentes et précises selon leurs compositions. Les positions de chaque bande sont caractéristiques de chaque fraction. Elles sont en rapport avec leur polarité et le système utilisé, caractérisé par le support comme phase immobile et le système d'éluant comme phase mobile. L'utilisation de plusieurs systèmes d'éluant permet alors de séparer distinctement les différentes fractions de l'extrait et de définir le solvant de migration adéquat. Pour le cas de l'extrait 17, ce système est constitué de plaque de silice (F₁₅₀₀/SL₂₅₄) comme support immobile et du système hexane/acétate d'éthyle [3/1] comme phase mobile.

Après 24 heures d'incubation du chromatogramme de l'extrait 17 inoculé de culture de *Bacillus subtilis*, ce chromatogramme est révélé par le MTT. Des zones claires qui ne se colorent pas en bleu violacé correspondant à des zones d'inhibition sont observées au niveau des bandes à des références frontales égales à 0,38 et 0,88 (Figure 13). Ce sont ces 2 fractions qui sont actives et elles agissent sur la croissance de *Bacillus subtilis* en l'inhibant, d'où l'absence de la coloration bleu violacé. Ces fractions correspondent aux constituants de l'extrait qui lui donnent probablement son pouvoir antibactérien. Il serait probable que ce sont ces fractions qui sont responsables de l'activité antibactérienne de l'extrait 17 sur *Bacillus subtilis*. Il serait possible aussi que ces composés agissent en même temps ou séparément. Les résultats obtenus au cours de cette méthode vérifient ceux obtenus au cours de la méthode de diffusion sur gélose et de la méthode de microdilution pour la recherche de la CMI et de la CMB sur l'activité de l'extrait à l'acétate d'éthyle 17 contre *Bacillus subtilis*.

Concernant la méthode de CCM-bioautographie directe, elle présente certains avantages. Cette méthode permet de situer précisément la ou les fractions actives d'un extrait actif brut. Elle peut être aussi appliquée sur différentes souches indicatrices comme les bactéries pathogènes autres que *Bacillus subtilis*, les souches de *Candida albicans* et certaines souches de champignons filamenteux.

III-5- Criblage chimique des extraits actifs :

Après les révélations, avec des réactifs chimiques spécifiques, des chromatogrammes de l'extrait 17 (actif sur *B. subtilis*), sur plaque de silice F₁₅₀₀ /SL₂₅₄ et dans un système d'éluant hexane/acétate d'éthyle [3/1], les observations de la couleur des fractions montrent que l'extrait contient des terpènes, des dérivés anthracéniques, des coumarines et des flavonoïdes. Il ne contient pas de saponines et d'alcaloïdes (Tableau 7). Autre que les fractions observées sous UV, des fractions supplémentaires sont révélées et sont colorées par les réactifs spécifiques (Figure 14).

Suite à une séparation de constituants par CCM, des composés sont révélés après observation sous lumières UV aux longueurs d'onde de 254 nm et de 365 nm. Ce type de révélation est très limitant car certains composés ne se dévoilent et ne deviennent visibles qu'après la pulvérisation des révélateurs chimiques [49]. Ce cas est observé avec le chromatogramme de l'extrait 17 où 5 fractions sont observés sous lumières UV et 13 fractions, après la pulvérisation avec des révélateurs chimiques. Selon la nature chimique des composés constitutifs de l'extrait 17 qui est actif contre *Bacillus subtilis*, le ou les composés actifs peuvent être des terpènes, des dérivés anthracéniques, des coumarines et des flavonoïdes. L'ensemble de ces composés ou quelques uns de ces composés peut être donc le responsable de l'activité de l'extrait sur *B. subtilis*.

La comparaison des chromatogrammes et des *R_f* des fractions au cours de la CCM-bioautographie directe sur *Bacillus subtilis* et de ce criblage chimique montre que les fractions actives correspondent à des composés terpéniques (Tableau 7). Ces fractions se colorent en bleu ou en vert après pulvérisation avec de l'anisaldéhyde sulfurique à 5% (Figure 14). C'est donc probable que ce soit ces composés terpéniques qui sont actifs contre *Bacillus subtilis*. En plus de cela, les composés terpéniques se trouvent à des positions distinctes avec des *R_f* différents. Il serait possible que ce soit des composés de structures distinctes mais cela n'écarterait pas l'hypothèse que ce sont des composés de structures apparentées.

CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES

La présente étude a pour objectif de valoriser les champignons endophytes de *Pothos scandens* en les soumettant à des tests antimicrobiens.

Durant cette étude, parmi les 115 souches de champignons endophytes issus des tiges et des feuilles de cette plante, seuls deux champignons, n°1867 (isolé des tiges) et n°1918 (isolé des feuilles) ont montré une activité contre les phytopathogènes *Colletotrichum gloeosporioides*, *Guignardia sp.*, *Fusarium oxysporum* et *Rhizoctonia solani*, en dualité culturale lors de l'étape préliminaire avec un taux d'inhibition autour de 40%.

Ces deux champignons endophytes ont produit des métabolites secondaires après 8 semaines de culture par fermentation sur des milieux liquides, PDB et OB. L'extraction en cascade de ces métabolites par des solvants organiques à polarité ascendant a conduit à l'obtention des extraits dichlorométhaniques, des extraits à l'acétate d'éthyle et des extraits méthanoliques, dont le poids se situe entre 27,80 mg à 3050 mg.

Les tests d'activité antimicrobienne de ces extraits ont montré que les extraits 7, 8, 19 et 20 (extraits à l'acétate d'éthyle issus du champignon endophyte n°1867) inhibent la croissance de *Colletotrichum gloeosporioides* avec un taux d'inhibition jusqu'à 40% ; et que l'extrait 17 (extrait à l'acétate d'éthyle issu du filtrat de culture sur PDB du champignon endophyte n°1918) est actif sur *Bacillus subtilis*, avec un diamètre d'inhibition de 9,5 mm à la concentration de 400 µg/disque, au cours de la méthode de diffusion sur gélose. L'extrait 17 a une CMI égale à 2,5 mg/ml et une CMB supérieur à 10 mg/ml lors de la méthode de microdilution et comporte des fractions actives avec des références frontales égales à 0,38 et 0,88, d'après la méthode de CCM-bioautographie directe sur *Bacillus subtilis*.

Les criblages chimiques de l'extrait 17 qui est actif sur *Bacillus subtilis* ont montré que cet extrait contient des terpènes, des flavonoïdes, des coumarines et des dérivés anthracéniques et les fractions actives sur *B. subtilis* correspondent à des composés terpéniques.

Ce travail a permis alors de rechercher les activités antimicrobiennes des métabolites secondaires sécrétés par les champignons endophytes de *Pothos scandens*. Il a permis également de maîtriser diverses techniques sur la dualité culturale des champignons, la culture par fermentation, l'extraction des métabolites secondaires, les tests d'activité antimicrobienne,

la chromatographie sur couche mince et le criblage chimique des différents composés constitutifs d'un produit.

Il serait intéressant de réaliser à l'avenir des recherches sur les métabolites secondaires qui ont inhibé la croissance des autres phytopathogènes et de les tester également sur les bactéries et levure de référence. Autrement, l'authentification *in vivo* des résultats obtenus serait utile. Il est d'autant plus captivant d'identifier les deux champignons endophytes n°1867 et 1918. Il est toutefois non négligeable de valoriser et d'identifier les autres champignons endophytes car ils peuvent être des sources de nouvelles molécules intéressantes et pourraient permettre la découverte de nouveaux taxa.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Adjanohoun E.J., Ake Assi L., Ahmed A., Eyme Y., Guinko S., Kayonga A., Keita A. et Lebras M. (1967). Médecine traditionnelle et pharmacopée : Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques aux Comores. p 190-191.
2. Agrios, G.H. (1997). Plant Pathology. Academic Press, London.
3. Arnold, A.E. and Herre, E.A. (2003). Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Mycologia* **95**: 388-398.
4. Bacon, C.W and Hill, N.S. (1996). Symptomless grass endophytes: products of coevolutionary symbioses and their role in the ecological adaptations of infected grasses. In *Endophytic fungi in Grasses and Woody Plants* (S.C. Redlin and L.M. Carris, eds): 155-178. American Phytopathological Society Press, St Paul, MN.
5. Bacon, C.W. and White, J.F. (2000). Physiological adaptations in the evolution of endophytism in the *Clavicipitaceae*. In *Microbial Endophytes* (C.W. Bacon and J.F. White, eds): 237-261. Marcel Dekker, New York.
6. Ballio, A.F., Bossa, F., Digioio, P., Ferranti, P., Paci, M., Pucci, P., Scaloni, A., Segre, A. and Strobel, G.A. (1994). Structure of the pseudomycins, new lipodepsipeptides produced by *Pseudomonas syringae* MSU 16H. *FEBS let.* **355**: 96-100.
7. Bills, G.F. (1996). Isolation and analysis of endophytic fungal communities from woody plants. In *Endophytic Fungi in Grasses and Woody plants* (S.C Redlin and L.M. Carris, eds): 31-66. American Phytopathological Society Press, St Paul, MN.
8. Bogner, J. (1975). ARACEAE. Flore de Madagascar et des Comores.
9. Botanical Dermatology Database. Araceae-4. Pinellia-Zantedeschia (Arum family). *Pothos scandens*. [<http://www.bodd.cf.ac.uk>]. (02 février 2008). 288 ko.
10. Bultman, T.L. and Murphy, J.C. (2000). Do fungal endophytes mediate wound-induced resistance? In *Microbial Endophytes* (C.W. Bacon and J.F. White, eds): 421-455. Marcel Dekker, New York.
11. Chopra R.N., Chopra I.C., Handa K.L. and Kapur L.D. (1958). CHOPRA's Indigenous Drugs of India. 2è édition. p. 606-608.

12. Christensen, M.J., Bennett, R.J. and Schmid, J. (2002). Growth of *Epichloe/Neotyphodium* and p-endophytes in leaves of *Lolium* and *Festuca* grasses. *Mycological Research* **106**: 93-106.
13. Clay K. (1989). Clavicipitaceous endophytes of grasses: their potential as biocontrol agents. *Mycological Research* **92**: 1-12.
14. Deckert, R.J., Melville, L., and Peterson R.L. (2001). Structural features of a *Lophodermium* endophyte during the cryptic life cycle in the foliage of *Pinus strobes*. *Mycological Research* **105**: 991-997.
15. Eberlin T. (1994). Les antibiotiques : classification, mode d'action, utilisation thérapeutique. Ed. Nathan, Paris.
16. Eloff, J.N. (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extract for bacteria. Dept of Pharmacology, University of Pretoria, South Africa. 8p.
17. Elsworth R. (1960). Developments in fermentor design and fermentation. *Prog. Ind. Microbiol*, **2**, 103.
18. Feller I.C., (1995). Effects of nutrient enrichment on growth and herbivory of dwarf red mangrove (*Rhizophora mangle*). *Ecological Monographs* **65**: 477 – 505.
19. Ganesh Mani Pradhan & Son. *Pothos scandens*. [<http://www.kreisels.com>]. (29 janvier 2008). 51 ko.
20. Gardes M. (2002). An orchid fungus marriage: Physical promiscuity, Conflict and Cheating. *New Phytologist* **154**: 4-7.
21. Gaylord Chemical Corporation. (2007). Profil et capacités. [<http://www.gaylordchemical.com>], (15 juillet 2008). 250 ko.
22. Guo, B.J., Dai, J., Ng, S., Huang, Y., Leong, C., Ong, W. and Carte, K. (2000). Cytonic acids A and B: Novel tridepsides inhibitors of hCMV protease from the endophytic fungus *Cytanoema* sp. *J. Nat. Prod.* **63**: 602-604.

23. Guo, L.D., Huang, G.R., Wang, Y., He., W.H., Zheng, W.H. and Hyde, K.D. (2003). Molecular identification of endophytic fungi from *Pinus tabulaeformis*. *Mycological Research* **107**: 680-688.
24. Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffee W.F, Kloepper J.W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiology* **43**: 895-914.
25. Harper, J.K., Ford, E.J., Strobel, G.A., Arif, A., Grant, D.M., Porco, j., Tomer, D.P. and Oneill, K. (2003). Pestacin: a 1,3-digydro isobenzofuran from *Pestalopsis microspora* possessing antioxydant and antimycotic activities. *Tetrahedron* **59**: 2471-2476.
26. Hawksworth, D.C. and Rossman, A.Y. (1987). Where are the undescribed fungi? *Phytopathology* **87**: 888-891.
27. Hewitt, W. and Vincent, S. (1989). Theory and application of microbiological assay. Academic Press, London.
28. Horn, W.S., Simmonds, S.J., Schwartz, R.E. and Blaney, W.M. (1995). Phomopsichalasin, a novel antimicrobial agent from an endophytic *Phomopsis* sp. *Tetrahedron* **14**: 3969-3978.
29. Institut Pasteur (1981). Milieux et réactifs de laboratoire. Paris : Institut Pasteur Production.
30. Kobayashi, D.Y. and Palumbo, J.D. (2000). Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In *Microbial Endophytes* (Bacon, C.W and White, J.F, eds): 199 – 236. Marcel Dekker, New York.
31. Leclerc H., Izard D., Husson M.O., Wattre P., Jakubczak E. (1983). *Microbiologie générale*. 2ème Ed. Paris: Doins Editeurs, 369p.
32. Leipzig, (1996). Madagascar: Rapport de Pays pour la conférence technique internationale de la FAO sur les ressources phylogénétiques. [<http://www.fao.org>]. (06 fevrier 2008). 1387 ko.
33. Marsh, J. and Goode, J.A. (1994). Antimicrobial Peptides [Ciba Foundation Symposium 186], John Wiley and Sons, Chichester.

34. Mc Inroy J.A., Kloepper J.W. (1995). Population dynamics of endophytic bacteria in field grown sweet corn and cotton. *Can. J. Microbiol.* **41**: 895-901.
35. Missouri Botanical Garden. Current Specimen List for *Pothos scandens*. [<http://www.mbg.net>]. (29 janvier 2008). 310 ko.
36. Montealegre, J.R., Reyes, R., Pérez, L.M., Herrera, R., Silva, P. and Besoain, X. (2002). Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. *Electronic Journal of Biotechnology*, ISSN 0717-3458, vol. **6**, n°**2**, pp 115-127.
37. National Committee for Clinical Laboratory standards. (1990). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. NCCLS Document M7-A2. Villanova, PA.: NCCLS.
38. Peters A.F. (1991). Field and culture studies of *Streblonema* – *Macrocystis* new species *Ectocarpales Phaeophyceae* from Chile, a sexual endophyte of giant kelp. *Phycologia* **30**: 365 – 377.
39. Petrini O. (1991). Fungal endophytes of tree leaves. In: Andrews J.H., Hirano SS eds. Microbial ecology of leaves. Springer Verlag, New York, p179-187.
40. *Pothos scandens* in a Catalogue of Vascular Plants of Madagascar. [<http://www.eFloras.org>]. (29 janvier 2008). 242 ko.
41. *Pothos scandens* L. [<http://www.aroid.org>].(29 janvier 2008). 134 ko.
42. *Pothos scandens* var. *cognatus*. Ecology and Evolutionary Biology Plant Greenhouse: College of Liberal Arts and Sciences, University of Connecticut. [<http://florawww.eeb.uconn.edu>]. (29 janvier 2008). 510 ko.
43. *Pothos scandens*. [<http://www.tropicos.org/image>]. (15 septembre 2008). 23ko.

44. Premsharoen S. et al (2005). Ethnobotany in Bung Khong Long Non-Hunting Area, Northeast Thailand. *Kasetsart Journal Natural Science. The publication of Kasetsart University*; vol **39**, num **3**. [<http://www.rdi.ku.ac.th>]. (29 janvier 2008). 1399 ko.
45. Raherimandimby, M. (1986). Contribution à l'étude de la fermentation alcoolique par des levures floculées sur mélasses et hydrolysat d'amidon. [Thèse de Doctorat]. INSA, Toulouse, n°43 : 130 p.
46. Rajaonarivelo A.J. (2006). Contribution a l'étude des activités antimicrobiennes des métabolites secondaires de dix champignons endophytes de *Centella asiatica* (APIACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 88p.
47. Rakotoniriana E.F. (2004). Approche chimio-microbiologique de l'activité des huiles essentielles produites à l'institut Malgache de Recherches Appliquées IMRA. [Mémoire de DEFS : Biologie médicale]. Antananarivo : Université d'Antananarivo. Faculté de Médecine, 91p.
48. Rakotoniriana E.F., Munaut F., Decock C., Randriamampionona D., Andriambololoniaina M., Rakotomalala T., Rakotonirina E.J., Rabemanantsoa C., Cheuk K., Ratsimamanga U. S., Mahillon J., El-Jaziri M., Quentin-Leclercq J., Corbisier A.M. (2007). Endophytic fungi from leaves of *Centella asiatica*: occurrence and potential interactions within leaves. *Anthonie Van Leenwenhock* **93**: 27-36.
49. Randerath K. (1971). Chromatographie sur couche mince. Edition Gauthier Villars. Paris.
50. Ravelomanantsoa M.A. (2008). Etude microbiologique, essai de lutte biologique et conservation *ex-situ* du bananier « Poyo » variété *Batavia cavendish*. [Mémoire de DEA : Biologie et Ecologie Végétale]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 46p.
51. Redman R.S and Rodriguez R.J. (2002). Characterization and isolation of an extracellular serine protease from the tomato pathogen *Colletotrichum coccodes*, and its role in pathogenicity. *Mycological research* **106**: 1427-1434.

52. Saias, E. (1960). Chromatographie des antibiotiques. In: Chromatographie en chimie organique et biologique. *Monographie de chimie organique*. Vol. **II**. Edition Masson et Cie. Paris.
53. Schulz, B., Guske, S., Damman, U. and Boyle, C. (1998). Endophyte host interaction II. Defining symbiosis of the endophyte host interaction. *Symbiosis* **25**: 213-227.
54. Simons P. et Meunier R. (1970). Microbiologie industrielle et génie biochimique. Edition : Masson et Cie, Paris.
55. Sinclair J.B., Cerkaskas R.F. (1996). Latent infection vs. Endophytic colonization by Fungi. *Endophytic Fungi in grasses and Woody Plants: Systematics, Ecology and Evolution*. Chap **1**: 3-29.
56. Stone J.K., Bacon C.W. and White J.F. (2000). An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In Microbial Endophytes (Bacon, C.W and White, J.F, eds): 199 – 236. Marcel Dekker, New York.
57. Stone, J. and Petrini, O. (1997). 8 Endophytes of Forest Trees: a Model of Fungus-Plant interaction. *The Mycota V, Part B: Plant Relationships* (Caroll and Tudzynski, eds). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
58. Strobel G.A. (2002). Rainforest Endophytes and Bioactive Products. *Critical Reviews in Biotechnology* **22** (4): 315-333.
59. Strobel, G.A and Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: 491-502.
60. Strobel, G.A., Miller, R.V., Miller, C., Condrón, M., Teplow, D.B. and Hess, W.M. (1999). Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf quercinia*. *Microbiology* **145**: 1919-1926.
61. Strobel, G.A., Stierle, A., Stierle, D. and Hess, W.M. (1993). *Taxomyces andreane* a proposed new taxon for a bulbilliferous hyphomycete associated with Pacific yew. *Mycotaxon* **47**: 71-78.

62. Suske, J. and Acker, G. (1989). Identification of endophytic hyphae of *Lophodermium piceae* in tissues of green symptomless Norway spruce needles by immunoelectron microscopy. *Canadian Journal of Botany* **67**: 1768-1774.
63. Tan, R. X. and Zou, W. X. (2001). Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep.* **18**: 448–459.
64. Wagner, H., Blatt, S., Zgainski, E.M. Plant drug analysis. (1984). A thin layer chromatography atlas. New York. 481p.
65. White, J.F. Jr, Reddy, P.V., Bacon, C.W. (2000). Biotrophic Endophytes of Grasses: A systematic Appraisal. *Microbial Endophytes*, Part I (3): 49-62.
66. Wilson D. (2000). Ecology of Woody Plant Endophytes. *Microbial Endophytes*, Part III (15):389-420.
67. Zhang, B.G., Salituro, G., Szalkowski, D., Li, Z., Zhang, Y., Royo, I., Vilella, D., Dez, M., Pelaez, F., Ruby, C., Kendall, R.L., Mao, X., Griffin, P., Calaycay, J., Zierath, J.R., Heck, J.V., Smith, R.G. and Moller, D.E. (1999). Discovery of small molecule insulin mimetic with antidiabetic activity in mice. *Science* **284**: 974-981.
68. Zuccaro, A., Schulz, B. and Mitchell, J. (2003). Host-specificity, host-exclusivity and host-recurrence in saprobic fungi. *Mycological Research* **105**: 1449-1457.

ANNEXES

ANNEXE I: Liste des matériels et équipements :

- ✓ Agitateur EDMOND BUHLER,
- ✓ Autoclave Sanyo MLS-3780,
- ✓ Bain ultrason SONOCLEAN,
- ✓ Balance SARTORIUS,
- ✓ Balance METTLER,
- ✓ Bec bunsen,
- ✓ Boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre,
- ✓ Centrifugeuse HETTICH ROTANTA/R.,
- ✓ Cuve chromatographique CAMAG,
- ✓ Densitomètre DENSICHEK,
- ✓ Eprouvettes graduées,
- ✓ Erlenmeyers gradués,
- ✓ Etuve MEMERT,
- ✓ Fioles jaugées,
- ✓ Hotte à flux laminaire FLUFRANCE,
- ✓ Incubateur NAPCO,
- ✓ Incubateur SANYO,
- ✓ Micropipettes avec embouts plastiques,
- ✓ Microplaques à 96 puits,
- ✓ pH-mètre INOLAB,
- ✓ Pipettes,
- ✓ Plaque chauffante avec agitateur magnétique HB 450,
- ✓ Plaque de silice F₁₅₀₀/SL₂₅₄,
- ✓ Réfrigérateur PHILIPS,
- ✓ Rotavapor,
- ✓ Shaker orbital C-1 CLASSIC,
- ✓ Spectrophotomètre AWARENESS TECHNOLOGY INC,
- ✓ Tubes à essai.

ANNEXE II : Compositions des milieux de culture [29] :❖ Mueller Hinton Agar/Broth :

Extrait de bœuf	3 g/l
Hydrolysate de caséine	17,5 g/l
Amidon	1,5 g/l
Agar	15 g/l
pH	7,2 ± 0,2

❖ Potato Dextrose Agar/Broth (PDA/PDB) :

Pomme de terre	200 g/l
Sucre	20 g/l
Agar	15 g/l
pH	5,6 ± 0,2

❖ Nutritive Agar/Broth (NA/NB) :

Extrait de bœuf	1 g/l
Extrait de levure	2 g/l
Peptone	5 g/l
NaCl	5 g/l
Agar	15 g/l
pH	6,8 ± 0,2

❖ Sabouraud solide :

Peptone	10 g/l
Glucose	20 g/l
Agar	15 g/l
pH	5,6 ± 0,2

❖ Oats meal Agar/Broth (OA/OB)

Flocon d'avoine	10 g/l
Agar	15 g/l
pH	5,6 ± 0,2

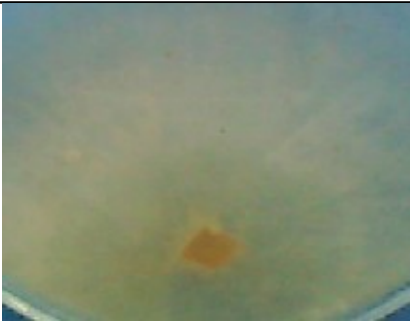
❖ Composants additionnels des milieux liquides PDB et OB lors de la production de métabolites secondaires (Deuxième étape) :

Extrait de levure	1 g/l	
CuSO ₄	0,5 g/l	} 10 ml/l
ZnSO ₄	1 g/l	

ANNEXE III : Les souches indicatrices :❖ Les champignons phytopathogènes indicateurs :

Classifications	Caractéristiques	Pathologies
-----------------	------------------	-------------

<u>Règne :</u> PLANTAE <u>Embranchement :</u> FUNGI <u>Division :</u> DEUTEROMYCOTINA <u>Classe :</u> COELOMYCETES <u>Groupe :</u> PHIALOSPORES <u>Genre :</u> <i>Colletotrichum</i> <u>Espèce :</u> <i>gloeosporioides.</i>	 Mycélium marron.	- Anthracnose.
<u>Règne :</u> PLANTAE <u>Embranchement :</u> FUNGI <u>Division :</u> ASCOMYCOTINA <u>Classe :</u> LOCULOASCOMYCETES <u>Ordre :</u> DOTHIDEALES <u>Famille :</u> DOTHIDEACEAE <u>Genre :</u> <i>Guignardia sp.</i>	 Mycélium noir.	- Parasite foliaires.
<u>Règne :</u> PLANTAE <u>Embranchement :</u> FUNGI <u>Division :</u> DEUTEROMYCOTINA		- Pourriture des tissus, kératites des pieds.

<u>Classe :</u> HYPHOMYCETES <u>Groupe :</u> PHRAGMOSPORES <u>Genre :</u> <i>Fusarium</i> <u>Espèce :</u> <i>oxysporum.</i>	Mycélium blanc violacé.	
<u>Règne :</u> PLANTAE <u>Embranchement :</u> FUNGI <u>Division :</u> DEUTEROMYCOTINA <u>Classe :</u> HYPHOMYCETES <u>Genre :</u> <i>Rhizoctonia</i> <u>Espèce :</u> <i>solani.</i>	 Mycélium blanc-cassé.	- Lésions sur les racines, les collets, les hypocotyles, les feuilles et les fruits.

❖ Les bactéries et levure indicateurs :

Noms	Caractéristiques	Maladies causées
<i>Bacillus subtilis</i>	- Bacille. - Gram positif.	- Infection alimentaire toxique.
<i>Candida albicans</i>	- Levure filamenteuse (Champignon	- Mycose au niveau de la peau, des appareils génitaux, urinaires et

	imparfait).	respiratoires. - Méningite. - Muguet orale et vulvo-vaginale.
<i>Escherichia coli</i>	- Bacille. - Gram négatif.	- Gastro-entérite. - Diarrhée.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	- Bacille. - Gram négatif.	- Infection des plaies et brûlures, de l'œil, et de l'oreille. - Germe fréquent des infections nosocomiales.
<i>Salmonella typhi</i>	- Cocci. - Gram négatif.	- Fièvre typhoïde.
<i>Staphylococcus aureus</i>	- Cocci. - Gram positif.	- Abscess. - Conjonctivites. - Folliculites. - Furoncles. - Otites. - Pneumonies.
<i>Streptococcus faecalis</i>	- Cocci. - Gram positif.	- Agent témoin de la présence de matières fécales dans son milieu. - Germe fréquent des infections nosocomiales.

ANNEXE IV : Liste des solvants d'extraction par ordre de polarité ascendante :

- Heptane
- Hexane
- Pentane
- Cyclohexane
- Trichloroéthylène
- Tétrachlorure de carbone
- Di-isopropyl éther

- Toluène
- Xylène = Méthyl-t-butyl éther
- Benzène
- Diéthyl éther
- **Dichlorométhane**
- 1,2-Dichloroéthane
- Isopropanol
- Butylacétate
- Tetrahydrofurane = n-propanol = n-butanol
- Chloroforme
- **Acétate d'éthyle**
- Méthyl-éthyl-cétone
- Dioxane
- **Méthanol**
- Acétone
- Ethanol
- Acétonitrile
- Acide acétique
- Diméthyl sulfoxide
- Eau

ANNEXE V : **Norme utilisée pour la lecture d'un antibiogramme [31] :**

Diamètre du halo d'inhibition H (mm)	Degré de sensibilité du germe	Symbole
H < 7	Insensible.	-
$7 \leq H \leq 8$	Assez sensible.	+
$8 \leq H < 9$	Sensible.	++

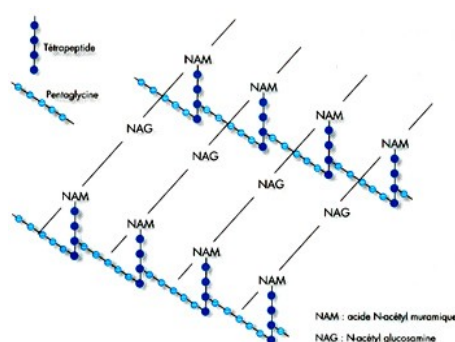
9 < H	Très sensible.	+++
-------	----------------	-----

ANNEXE VI : Structure des parois des bactéries et de la levure :

❖ La paroi des bactéries :

La paroi cellulaire est une enveloppe **rigide** assurant l'intégrité de la bactérie, donc **responsable de la forme** des cellules. Elle **protège** la bactérie des variations de pression osmotique. La partie commune à toutes les parois bactériennes est le **peptidoglycane**, enveloppe la plus interne.

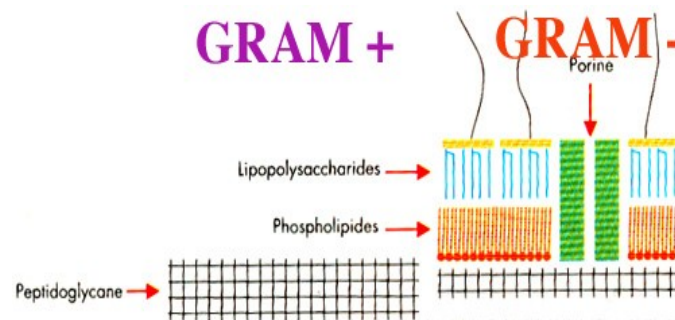
Le peptidoglycane est un **hétéropolymère composé de chaînes glucidiques** (N-Acétyle Glucosamine - Acide N-Acétyle Muramique) reliées les unes aux autres par des **chaînes peptidiques** (formés de quatre aminoacides toujours fixées sur l'acide muramique) **reliés** directement entre eux ou par une courte chaîne interpeptidique. La macromolécule réticulée tridimensionnelle est ainsi constituée et **sa solidité** dépend de l'importance des interconnexions. La paroi de la bactérie est ainsi une **unique macromolécule**.



Structure du peptidoglycane

Source: <http://www.uvp5.univ-paris5.fr>

La **composition de la paroi variant selon l'espèce** ou le groupe bactérien, il a été possible de distinguer des affinités tinctoriales différentes par la coloration: **Gram positif** et **Gram négatif** :



Comparaison des parois des bactéries à Gram positif et à Gram négatif

Source: <http://www.uvp5.univ-paris5.fr>

➤ La paroi des bactéries à Gram positif :

Le peptidoglycane est le **constituant majeur**. La **muréine** représente jusqu'à 30% du poids sec d'une cellule.

➤ La paroi des bactéries à Gram négatif :

Le peptidoglycane est en couche mince peu dense (< 15% du poids sec). L'autre constituant essentiel est un **lipide complexe (A)** couplé à la glucosamine et à des résidus phosphore qui est amphiphile, possédant une partie hydrophobe et une partie hydrophile. Sur les résidus glucosamine, des **polysaccharides complexes** sont fixés et forment la partie la plus externe de la paroi. Ils sont essentiels pour la physiologie bactérienne dans les processus de pénétration de nutriments ou de toxiques, ils sont **spécifiques de sous-espèces** ou de types et comportent des sucres originaux: **antigènes O**.

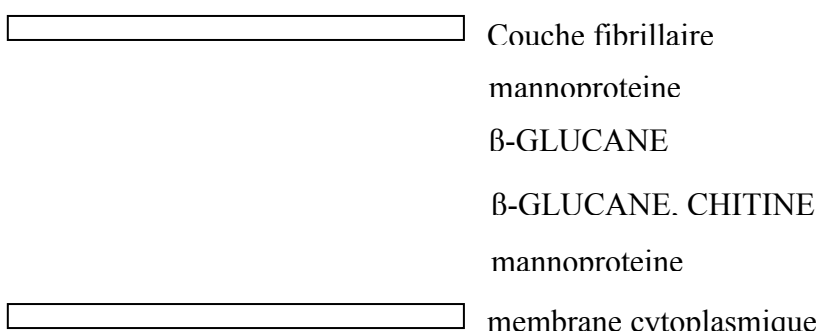
Des **phospholipides** se trouvent à l'intérieur. La membrane est successivement hydrophile (polysaccharide complexe), hydrophobe (lipide A et lipides des phospholipides), hydrophile (têtes hydrophiles des phospholipides).

Des **protéines** se trouvent enchâssées qui assurent la cohésion de la membrane, une liaison avec le peptidoglycane et des **fonctions diverses de perméabilité sélective** ou non. Les **porines**, seules structures de transport des composés hydrophiles, sont essentielles à la vie

de la bactérie mais aussi à l'action de certains antibiotiques. Enfin d'**autres protéines** servent à la captation d'ions (fer), ou de vitamines (facteurs de croissance).

❖ **La paroi de la levure :**

La paroi des levures a une épaisseur de 150 à 200 nm. Par sa rigidité, elle confère à la cellule une forme caractéristique. Elle est composée de polysaccharides 80%, de protéines 5-10%, de lipides 7-10% et de sels minéraux 5%. Les polysaccharides sont des mannanes, des β -glucanes, des polyosides hétérogènes et des chitines (1-2%) [46].



Paroi cellulaire de *Candida albicans*

ANNEXE VII: Composition des réactifs utilisés pour le criblage chimique [64] :

➤ **Solution anisaldéhyde sulfurique à 5% :**

85 ml de méthanol.

10 ml d'acide acétique glacial.

5 ml d'acide sulfurique.

0,5 ml anisaldéhyde.

➤ **Réactif de Dragendorff :**

Mélange à volume égal des deux solutions suivantes :

- Solution 1 : 1,7 g de nitrate de bismuth basique et 20 g acide tartrique dans 80 ml d'eau.
- Solution 2 : 16 g d'iodure de potassium dans 50 ml d'eau.

➤ **Solution éthanolique de KOH à 5% :**

5 g de KOH.

100 ml d'éthanol.

➤ **Solution NP/PEG :**

Mélange des deux solutions suivantes :

- Solution NP : Diphénylboryloxyéthylamine 1%, 10 ml.
- Solution PEG : Polyéthylèneglycol-4000 5%, 8 ml.

Name: RABOANATAHIRY

First Name: Haingotiana Nadia

Title: ANTIMICROBIAL ACTIVITY STUDY OF SECONDARY METABOLITES FROM *Pothos scandens* (ARACEAE) ENDOPHYTIC FUNGI.

Number of illustrations: 14

Number of tables: 7

ABSTRACT

Endophytic fungi (115) were isolated from *Pothos scandens*, an Asian plant used by indigent people for its therapeutic properties, but also seen in African country as Madagascar. Among one hundred and fifteen isolates, two endophytic fungi (n°1867 and n°1918) were noticed to have an antifungal activity against four plant pathogenic fungi in a dual culture. Secondary metabolites from these two endophytic fungi were tested on the four plant pathogenic fungi and on human pathogen bacteria and fungus by disk method, microdilution method and CCM-bioautography method.

Ethyl acetate extracts were the most active. The one (from n°1867) inhibited *Colletotrichum gloeosporioides* with 40% of inhibition rate and the other (from n°1918) inhibited *Bacillus subtilis* with a MIC near 2.5 mg/ml. Terpenes are the major constituents of the active extract against *Bacillus subtilis* and they might be the active components of the active extract.

Keywords: *Pothos scandens*, endophytic fungi, secondary metabolites, antimicrobial activity.

Trainer: Dr RAMAMONJISOA Daniel

Nom : RABOANATAHIRY

Prénoms : Haingotiana Nadia

Titre : ETUDES DES ACTIVITES ANTIMICROBIENNES DES
METABOLITES SECONDAIRES ISSUS DES CHAMPIGNONS
ENDOPHYTES DE *Pothos scandens* (ARACEAE).

Nombre de figures : 14

Nombre de tableaux : 7

RESUME

Des champignons endophytes (115) ont été isolés de *Pothos scandens*, une plante originaire d'Asie, utilisée par les indigènes à cause de ses multiples vertus, et rencontrée également sur les terres malgaches. Parmi ces cent quinze souches de champignons endophytes, deux d'entre-elles (n°1867 et n°1918) ont entravé la croissance de quatre champignons phytopathogènes lors d'une dualité culturale. Les métabolites secondaires issus de ces deux champignons endophytes ont été testés sur les quatre champignons phytopathogènes, sur des souches de bactéries et de levure pathogènes par la méthode de diffusion sur gélose, la méthode de microdilution et la méthode de CCM-bioautographie directe.

Les extraits à l'acétate d'éthyle ont été les plus actifs. Un de ces extraits, issu du champignon endophyte n°1867 a inhibé *Colletotrichum gloeosporioides* à 40% et un autre extrait, issu du champignon endophyte n°1918 a inhibé *Bacillus subtilis* avec une CMI proche de 2,5 mg/ml. Des composés terpéniques sont les composants majoritaires de l'extrait actif sur *Bacillus subtilis* et sont probablement les acteurs de cette inhibition de *Bacillus subtilis*.

Mots clés : *Pothos scandens*, champignons endophytes, métabolites secondaires, activités antimicrobiennes.

Encadreur: Dr RAMAMONJISOA Daniel

